



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS**

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ALPORQUIA E
OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO *IN*
VITRO DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)**

BRUNO DOS SANTOS TIAGO

Orientador:
Prof. Sérgio Tadeu Sibov



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Bruno dos Santos Tiago

3. Título do trabalho

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ALPORQUIA E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO IN VITRO DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes).

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;

- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Dos Santos Tiago, Discente**, em 13/07/2023, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Tadeu Sibov, Professora do Magistério Superior**, em 17/07/2023, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3890957** e o código CRC **FA784FC4**.

BRUNO DOS SANTOS TIAGO

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ALPORQUIA E OTIMIZAÇÃO
DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas na Área de concentração genética e melhoramento de plantas

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

GOIÂNIA,

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Tiago, Bruno dos Santos
PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ALPORQUIA E OTIMIZAÇÃO
DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO IN VITRO DE
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes) [manuscrito] / Bruno
dos Santos Tiago. - 2020.
LXVIII, 68 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Tadeu Sibov.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Agronomia (EA), Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. propagação. 2. melhoramento. 3. cultura de tecidos. 4. mangaba.
5. cerrado. I. Sibov, Sergio Tadeu, orient. II. Título.

CDU 633



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 0041/2020 da sessão de Defesa de Dissertação de **Bruno dos Santos Tiago**, que confere o título de Mestre(a) em **Genética e Melhoramento de Plantas**, na área de concentração em **Genética e Melhoramento de Plantas**.

Aos 28/02/2020 vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, a partir das 08:00horas, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – PPGA EA/UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ALPORQUIA E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO IN VITRO DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Sérgio Tadeu Sibov** – (ICB – UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Rita Maria Devós Ganga** – (EA – UFG), membro titular externo; Professora Doutora **Renata Alves de Aguiar** – (EA – UFG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **Não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **Sérgio Tadeu Sibov** – (ICB – UFG), Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 28/02/2020 vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Tadeu Sibov, Coordenador de Pós-graduação**, em 28/02/2020, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Alves De Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rita Maria Devós Ganga, Professora do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1175250** e o código CRC **06356D23**.

“Por este Brasil tão vasto,
Do campo vejo sinais
O Cerrado virou pasto
E o pasto, canaviais.
O progresso é sempre assim
Alguém sai prejudicado
Até mesmo esse jardim
Das planícies do Cerrado.”

Geovane Alves de Andrade

A meu amado, Hander Célio Pereira Kichese, por
permanecer ao meu lado com seu carinho e atenção.

DEDICO

A minha Mãe Iracelma, Pai Tiago e amiga Camila
Silva, por sempre me apoiarem e não medirem
esforços para que eu alcançasse este objetivo.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Um longo processo nos leva da ignorância ao conhecimento, o caminho é nada fácil de percorrer. Neste trabalho tenho imensa gratidão ao meu orientador Dr. Sérgio Tadeu Sibov, que me acolheu e proporcionou o conhecimento sobre o que é ser um pós-graduando; teve paciência e sabedoria de lidar com os erros e acertos do dia a dia, teve um discente ansioso que deseja fazer tudo ao mesmo tempo. Meu agradecimento vai a equipe de pesquisa diária, Emiliane dos Santos Belo, colega de laboratório e parceira de pesquisa com a mangaba; Paulo Roberto de Farias, técnico de laboratório e casas de vegetação, sempre disponível e acessível a novas ideias. Agradeço a grande amiga de vida, Camila Silva dos Santos que sempre entendeu das dificuldades diárias e sempre esteve presente com seu ombro amigo para os desabafos. A meu amado Hander Célio Pereira Kichese, que me deu total suporte no decorrer de toda a minha pesquisa, agradeço. À Universidade Federal de Goiás e à Escola de Agronomia por ser um órgão público e gratuito, que mantém suas portas abertas, recebendo sempre sonhadores que buscam melhorias em suas vidas na maior fonte de conhecimento da vida de um acadêmico, a universidade. A meus pais Sueli e Tiago pelo apoio, participação e contribuição com a construção do ser que sou hoje.

Agradeço!

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 A ESPÉCIE <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	12
2.2 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO.....	17
2.2.1 PROPAGAÇÃO POR SEMENTES.....	19
2.2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	20
2.2.2.1 Estaquia.....	20
2.2.2.2 Alporquia.....	21
2.2.2.3 Micropropagação.....	22
2.2.2.4 Cultura de tecidos vegetais de espécies do Cerrado	24
3 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO IN VITRO DE MANGABEIRA (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes var. <i>gardineri</i>)	
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
3.1 INTRODUÇÃO.....	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.1 Comparação na germinação in vitro de sementes e embriões isolados	30
3.2.2 Tamanho mínimo do embrião isolado para germinação in vitro.....	30
3.2.3 Alongamento das plântulas com ácido giberélico - GA ₃	31
3.2.4 Enraizamento e aclimatização.....	32
3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	32
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.3.1 Comparação na germinação in vitro de sementes e embriões isolados	33

3.3.2	Tamanho mínimo do embrião isolado para germinação in vitro.....	34
3.3.3	Alongamento das plântulas com ácido giberélico - GA₃	35
3.3.4	Enraizamento e aclimatização.....	39
3.4	CONCLUSÕES	43
4	ALPORQUIA EM QUATRO VARIEDADES DE MANGABEIRA <i>(Hancornia speciosa</i> Gomes var.: <i>gardineri</i> , <i>speciosa</i> , <i>cuyabensis</i> e <i>pubescens</i>)	
	RESUMO	44
	ABSTRACT	45
4.1	INTRODUÇÃO	46
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.2.1	Alporquia em duas fases fenológicas distintas.....	48
4.2.1	Delineamento experimental e análises estatísticas.....	49
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.3.1	Alporquia em duas fases fenológicas distintas.....	50
4.3.2	Aclimatização.....	55
4.4	CONCLUSÕES	56
5	REFERÊNCIAS	57

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

± – Variando entre

°C – Grau Celsius

½ MS – Meio Murashige & Skoog (1962) com metade da concentração dos macronutrientes

AIB – Ácido indol-butírico

ANA – Ácido naftalenoacético

Atm - Atmosfera

BAP – 6-Benzilaminopurina

C.A. – Cloro ativo

cm² – Centímetros quadrados

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

g - Grama

g.L⁻¹ – Gramas por litro

GO – Goiás

h – horas

Hz - Hertz

ICB-I/UFMG – Instituto de Ciências Biológicas – I, da Universidade Federal de Goiás

ITS – Instituto do Trópico Subúmido

mg.L⁻¹ – Miligramas por litro

mL – Mililitros

mm – Milímetros

MS – Meio Murashige & Skoog (1962)

NaOCl – Hipoclorito de sódio

ns – Não significativo

pH – Potencial hidrogeniônico

PVP – Polivinilpirrolidona

UFMG – Universidade Federal de Goiás

T(n-1) – Tratamento (1, 2, 3, ..., n-1)

WPM – Wood Plant Medium

RESUMO

TIAGO, B. S. PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ALPORQUIA E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes) 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) -Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.¹

Hancornia speciosa Gomes, popularmente conhecida como mangabeira, é uma espécie frutífera nativa do Cerrado utilizada para fins alimentícios e como fitoterápico. Atualmente, pela perda de habitat e pelo extrativismo predatório, há uma grande demanda em mais estudos para a conservação e uso desta frutífera. O estabelecimento *in vitro* da espécie apresenta como principal desafio o elevado número de agentes endofíticos (fungos e bactérias) que estão presentes nos tecidos da planta. Isso torna mais difícil a introdução de material vegetal na cultura *in vitro*. Este trabalho visou otimizar os protocolos de estabelecimento *in vitro* além de realizar a propagação vegetativa, via alporquia, gerando clones de plantas matrizes. Para o estabelecimento *in vitro* de uma das variedades da espécie, a var. *Gardineri*, primeiro coletou-se os frutos de queda, na Coleção de Frutíferas Nativas do Cerrado da Escola de Agronomia da UFG. Os frutos foram despulpados e selecionou-se 80 sementes que tiveram seu tegumento removido e seguiram para o processo de descontaminação. Em câmara de fluxo laminar, dois grupos de sementes foram separados: 40 sementes foram abertas e seus embriões expostos, isolados e inoculados em meio de cultura MS; as outras 40 sementes foram inoculadas diretamente em meio de cultura MS. Para testar o efeito do alongamento na redução do período de desenvolvimento *in vitro*, embriões foram inoculados em tratamentos com 0, 1, 2 e 4 μM de ácido giberélico (GA_3) e posteriormente em um segundo experimento em meio MS com 1,0 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), com concentrações menores de GA_3 : 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 μM . Para a etapa seguinte, realizou-se tratamentos para o enraizamento dos novos brotos com ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações 0, 1, 3, 5 e 7 mg.mL^{-1} . A germinação dos embriões isolados apresentou menos de 5% de contaminação e foi 30% mais rápida quando comparada com a semente. O efeito do GA_3 nos embriões isolados possibilitou o alongamento da planta com 0,8 μM , atingindo 130 mm em 75 dias, reduzindo em mais de 100 dias o cultivo *in vitro*. No enraizamento, a concentração de 1 mg.mL^{-1} de AIB possibilitou mais de nove raízes por planta e comprimento médio de 54 mm. A aclimatização das plantas dos tratamentos aconteceu em substrato com 50% de areia e 50% de lato solo vermelho com substrato comercial. Neste processo a mortalidade foi inferior a 10%. Os experimentos de alporquia foram realizados com quatro variedades de *H. speciosa*: *gardineri*, *speciosa*, *cuyabensis* e *pubescens* e em duas épocas distintas: a estação seca, e a estação chuvosa. Utilizou-se AIB para a indução de enraizamento nas concentrações de 4 mg/mL^{-1} , 5 mg.mL^{-1} e 6 mg.mL^{-1} e controle com 0 mg.mL^{-1} , sendo aplicado 15 ml por ramo. O substrato usado foi solo humificado com substrato comercial fixado no ramo anelado. Após 180 dias, os melhores resultados foram na concentração de 5 mg.mL^{-1} nas quatro variedades utilizadas. Porém, os resultados em cada variedade, sofreram variação de acordo comas diferentes estações do ano, devido as fases fenológicas específicas.

¹ Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov. ICB-UFG.

ABSTRACT

TIAGO, B. S. VEGETATIVE PROPAGATION BY ALPORQUIA AND OPTIMIZATION OF IN VITRO ESTABLISHMENT PROTOCOL OF MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes) 2019. 57 f. Dissertation (Master in Genetics and Plant Breeding) - School of Agronomy, Federal University of Goiás, Goiânia, 2019.

Hancornia speciosa Gomes, popularly known as mangabeira, is a native fruit species of the Cerrado used for food purposes and as herbal medicine. Currently, due to habitat loss and predatory extraction, there is a great demand in more studies for the conservation and use of this fruit species. The main challenge for the in vitro establishment of the species is the high number of endophytic agents (fungi and bacteria) that are present in plant tissues. This makes it more difficult to introduce plant material into the in vitro culture. This work aimed to optimize the in vitro establishment protocols in addition to carrying out vegetative propagation, via layering, generating clones of matrix plants. For the in vitro establishment of one of the varieties of the species, var. *gardineri*, first the fall fruits were collected in the Collection of Native Fruits of the Cerrado of the School of Agronomy at UFG. Fruits were pulped and 80 seeds were selected, which had their tegument removed and proceeded to the decontamination process. In a laminar flow chamber, two groups of seeds were separated: 40 seeds were opened and their embryos exposed, isolated and inoculated in MS culture medium; the other 40 seeds were inoculated directly in MS culture medium. To test the effect of stretching on reducing the period of development in vitro, embryos were inoculated in treatments with 0, 1, 2 and 4 μM of gibberellic acid (GA_3) and later in a second experiment in MS medium with 1,0 μM of 6-benzylaminopurine (BAP), with lower concentrations of GA_3 : 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1 μM . For the next stage, treatments were carried out to root the new shoots with indolbutyric acid (IBA) in concentrations 0, 1, 3, 5 and 7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The germination of the isolated embryos showed less than 5% of contamination and was 30% faster when compared to the seed. The effect of GA_3 on isolated embryos allowed the plant to elongate with 0.8 μM , reaching 130 mm in 75 days, reducing in vitro cultivation by more than 100 days. In rooting, the concentration of 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of AIB allowed more than 9 roots per plant and an average length of 54 mm. The acclimatization of the treatment plants took place on substrate with 50% sand and 50% broad red soil with commercial substrate. In this process, mortality was less than 10%. The layering experiments were carried out with four varieties of *H. speciosa*: *gardineri*, *speciosa*, *cuyabensis* and *pubescens* and in two different seasons: the dry season, and the rainy season. AIB was used to induce rooting at concentrations of 0, 4, 5 and 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, with 15 ml per branch. The substrate used was soil humidified with commercial substrate fixed to the ringed branch. After 180 days, the best results were in the concentration of 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the four varieties used. However, the results for each variety were at different times of the year, due to the specific phenological phases.

INTRODUÇÃO GERAL

A necessidade de conservação do Cerrado e o fortalecimento da política ambiental promoveram um aumento na demanda sobre pesquisas, especialmente, nas técnicas de propagação e conservação de espécies nativas, elementos centrais de programas de recuperação e conservação de ecossistemas. A estratégia de conservação da biodiversidade envolve os métodos *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies no seu habitat por meio de unidades de conservação, como os parques nacionais (Brasil, 2000). Métodos *ex situ* consistem na conservação das espécies fora do seu habitat e devem ser realizados de forma complementar à conservação *in situ*. Conservação vegetal envolve a manutenção de uma representatividade da biodiversidade, de importância científica ou econômico-social, inclusive para o desenvolvimento de programas de pesquisa, como os de melhoramento genético. Uma alternativa que vem crescendo muito na cultura de tecidos é a criação de centros de preservação criogênica, usando a criopreservação (Arnao & Engelmann, 2013).

O sucesso do armazenamento de sementes para a preservação, depende do conhecimento sobre a fisiologia de cada espécie. Estes estudos possibilitam conhecer condições adequadas à manutenção da viabilidade para germinação (Hong & Ellis, 1996). As sementes são divididas em ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes. Os três grupos são caracterizados pelas condições de armazenamento e viabilidade de germinação.

Sementes ortodoxas se mantêm viáveis após dessecação com umidade em torno de 5%, e podem ser armazenadas sob baixas temperaturas por um longo período. De acordo com Hong e Ellis (1996), as sementes que apresentam comportamento intermediário toleram a desidratação máxima entre 7 e 10%, e não toleram baixas temperaturas durante período de tempo prolongado. As sementes recalcitrantes são sensíveis à temperatura e não toleram dessecação. No processo de desidratação reações químicas liberam toxinas que impedem o desenvolvimento do embrião vegetal, um meio de armazenamento dessas sementes e através de rápido congelamento, o que não garante total germinação após longo prazo (Roberts, 1973).

Sementes de *H. speciosa* Gomes são recalcitrantes, o que inviabiliza seu armazenamento, sendo necessário o uso de outras técnicas de propagação. A mangabeira tem poucos estudos em relação a sua propagação vegetativa. A reprodução vegetativa, chamada também de reprodução assexuada, é utilizada com o fim de produção de mudas geneticamente iguais à planta mãe. Essa metodologia garante a conservação de um indivíduo com características de interesse, ou buscando ampliar a quantidade de plantas visando a conservação das espécies (Hartmann et al., 2011). Para tal, algumas técnicas como estaquia, alporquia e micropropagação são utilizadas.

Com o intuito de aumentar a segurança de bancos de germoplasma é recomendado o uso de diferentes técnicas de conservação. Atualmente, a criopreservação é uma das técnicas mais pesquisadas e utilizadas como estratégia principal/coadjuvante na conservação de germoplasma (INPE et al., 2017). Bromélias são um bom exemplo, em que se armazena sementes sintéticas provenientes de embriões somáticos a -80°C , por meio da técnica de *droplet*. Na busca por melhorias das técnicas de propagação, esta pesquisa tem como objetivo a utilização de alporquia para a produção de mudas clonadas de matrizes de mangaba, advindas da coleção de nativas da Escola de Agronomia da UFG. Em laboratório os testes conduzidos serão as melhores opções para a *H. speciosa* Gomes, utilizando de ferramentas da cultura de tecidos, que proporcionarão resultados efetivos na produção de clones de plantas de campo e na diminuição do tempo de cultivo *in vitro*. Para a cultura de tecidos, diversas etapas fisiológicas são compreendidas para intervenções, que vão multiplicar uma planta em vários indivíduos por meio da micropropagação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ESPÉCIE *Hancornia speciosa* Gomes

Hancornia speciosa Gomes, popularmente conhecida como mangabeira, é uma espécie frutífera pertencente ao grupo das Eudicotiledôneas, ordem Gentianales e família Apocynaceae. É uma espécie típica das restingas do litoral nordestino e dos Cerrados do Centro-Oeste (Freire et al., 2011). Em razão do agradável sabor e aroma, o fruto é um dos mais conhecidos do Nordeste do Brasil (Bastos et al., 2007).

Hancornia é um gênero monotípico, distribuído principalmente em formações de cerrado, campo e campo rupestre de todas as regiões do Brasil. Ocorre espontaneamente desde a Região Nordeste, em tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas, até as Regiões Norte e Sudeste em áreas de cerrado (Monachino, 1945; Vieira Neto, 1994; BFG, 2010). *Hancornia speciosa* é uma espécie de ampla distribuição, presente em todas as regiões do Brasil, e que floresce e frutifica de novembro a fevereiro (Simões & Kinoshita, 2002; BFG, 2010). Na região Norte, é pouco frequente e restrita a manchas de cerrado e campo misto, sendo encontrada com maior frequência na ilha do Marajó. Flores e frutos são encontrados em praticamente todo o ano; no entanto o pico de produção ocorre em março, setembro e novembro (Villachica et al., 1996).

É uma espécie arbórea de porte médio, podendo chegar a até 15 m de altura, com o tronco tortuoso e áspero, suas folhas são opostas e coriáceas. As inflorescências são brancas e toda a planta exsuda látex, que pode ser usado na fabricação de borracha. O fruto é do tipo baga, com polpa branca e de sabor ácido, em formato elipsóide ou arredondado, com 5 a 15 cm de comprimento. A mangaba tem epiderme amarela, com manchas avermelhadas, de 2 a 15 sementes discóides achatadas de 7 a 8 mm de comprimento. O peso de cem sementes com 50% de umidade é, em média, de 18 g (Soares et al., 2002).

Hancornia speciosa é uma planta perenifólia de clima tropical que apresenta maior desenvolvimento vegetativo nas épocas com temperatura mais elevada. Os solos nos quais se desenvolve são pobres e arenosos, com floração durante o período de agosto a novembro, com pico em outubro. A frutificação pode ocorrer em qualquer época do ano, mas concentra-se principalmente de julho a outubro ou de janeiro a abril no Brasil (Soares et al., 2002).

No Cerrado, a mangabeira apresenta variações fenotípicas gerando seis tipos de variedades que possuem características morfológicas bem definidas. As seis variedades são: *Speciosa*, *Cuyabensis*, *Pubescens*, *Gardineri*, *Minor* e *Maximiliane*, Monachino (1945). Nas variedades *gardneri* e *pubescens*, predominam frutos redondos e verde-claros, enquanto em *speciosa* e *cuyabensis* predominam frutos de formato oblongo e coloração amarelo-escura e verde-escura, respectivamente. A var. *gardneri* apresenta porte mais alto que as demais (Ganga et al, 2010). Quanto a morfologia da planta, as folhas da var. *speciosa* se apresentam de forma oposta dística e são bem menores em relação às demais. As folhas da var. *cuyabensis* já são opostas cruzadas, a var. *pubescens* apresenta tricomas na face abaxial da folha e no pecíolo, a var. *gardineri* possui folhas opostas dísticas, porém até 60% maiores que na var. *speciosa* (Ganga et al, 2010).

O fruto de *H. speciosa* é amarelado com pequenas manchas vermelhas (Figura 2.2 - B), rico em vitaminas A, B1, B2 e C, além de ferro, fósforo, cálcio e proteínas. Possui grande potencial de mercado, porém a produção de frutos não atende à demanda, pois em sua grande maioria, os frutos são provenientes de atividade extrativista. Sua polpa branca tem leve sabor adocicado e um pouco ácida, pode ser consumida in natura e também sob a forma de doces, geleias, compotas, vinho, vinagre, suco e sorvete (Lederman et al., 2003).

As características biométricas de *H. speciosa* Gomes, são vistas na tabela abaixo (Tabela 2.1) e a representação gráfica (Figura 2.1) com as medições realizadas por material coletado em Salvaterra, Estrada para Água Boa (MG) e Vila Marucá (MG).

Tabela 2.1 Características biométricas e morfológicas da *Hancornia speciosa* Gomes.

Característica	Medição
Árvores	4-15 m de altura
Folhas opostas, pecíolo	0,4-1 cm comprimento
Lâmina foliar	6,2-2,5 × 2,5-1,1 cm
Morfologia foliar	elíptica, oblonga, lanceolada, ápice agudo a cuspidado, base aguda, atenuada a cuneada, faces adaxial e abaxial glabras, nervação broquidódroma (presença de tricomas em algumas variedades)
Nervuras secundárias predominantemente paralelas entre si e perpendiculares à nervura primária	34-58 pares
Inflorescência dicasial, terminal estreito-triangular a lineares, glabras a pubescentes	2-3-flora
Pedúnculo	4-11 mm comprimento
Brácteas	0,2-0,4 cm comprimento
Pedicelo	4-10 mm comprimento
Cálice com lacínias desiguais, ovais, sem coléteres na base	20-30 mm comprimento
Corola hipocrateriforme, branca; tubo inferior cilíndrico	2,9-3,2 × 0,2-0,25 cm
Tubo superior cilíndrico, face esverdeada	5-6 × 3-4 mm
Lobos oblíquo-lineares, reflexos a patentes	1,7-2 × 0,4-0,5 cm
Estames inseridos no terço superior do tubo; anteras dorso glabro	2,5-3 mm comprimento
Gineceu com ovário súpero, sincárpico, placentação parietal; disco nectarífero ausente	1,3-2 mm comprimento
Estilete cilíndrico, glabro	2,5-2,8 cm comprimento
Cabeça do estilete cilíndrica base espessada	2-2,5 mm comprimento
Fruto do tipo baga	2-3 × 1,2-2,5 cm
Sementes, orbiculares a ovaladas	16 a 32 com 1 × 0,7 cm

Fonte: Viana et al. (1980).

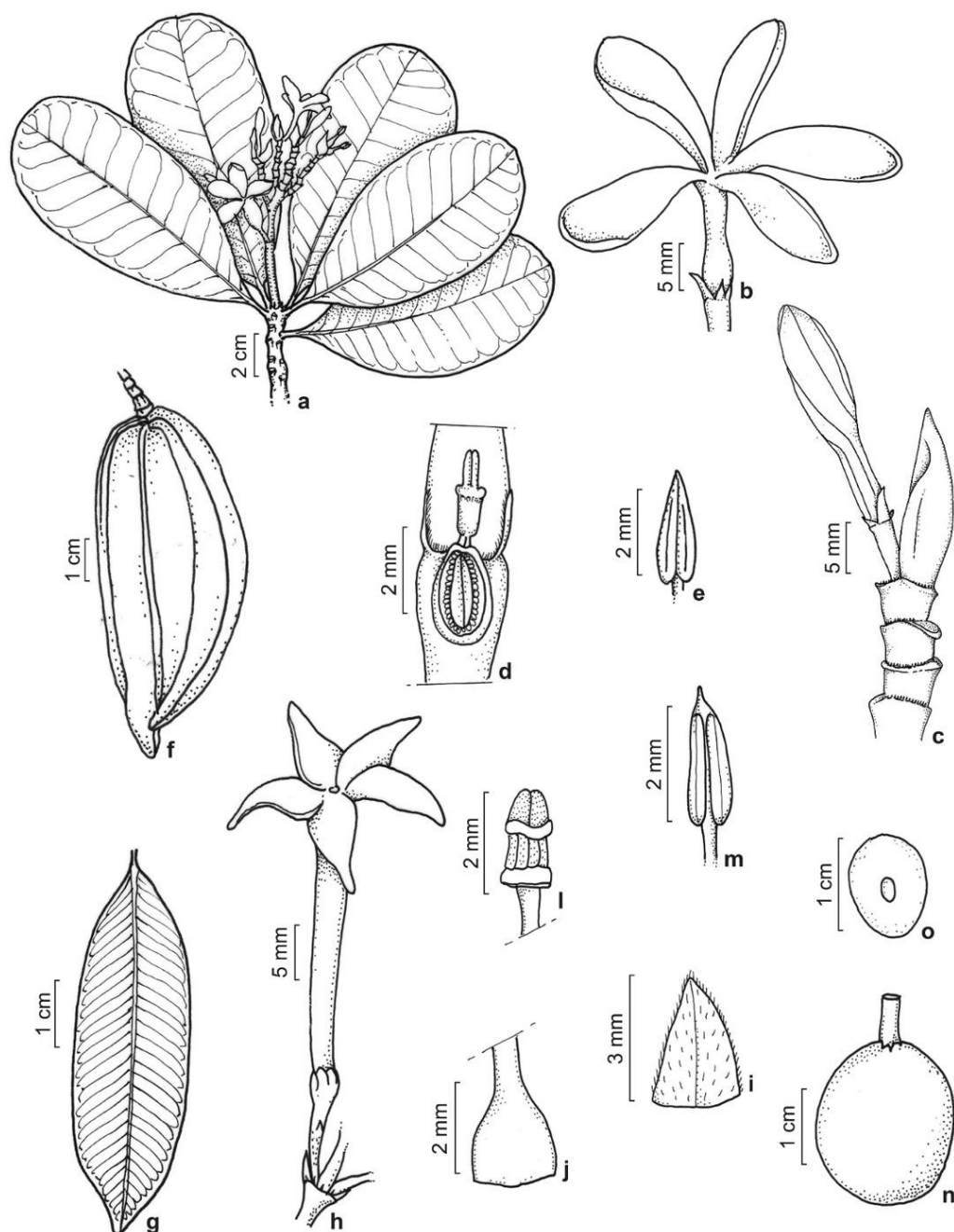


Figura 2.1 Representação gráfica da *Hancornia speciosa*. a. ramo florido; b. flor; c. parte da inflorescência com botão floral e bráctea; d. gineceu; e. antera; f. fruto; g-o: *Hancornia speciosa* Gomes – g. folha; h. flor; i. lacínias do cálice em vista abaxial; j. ovário; l. cabeça do estilete; m. antera em vista dorsal; n. fruto; o. semente. (Viana et al., 1980).

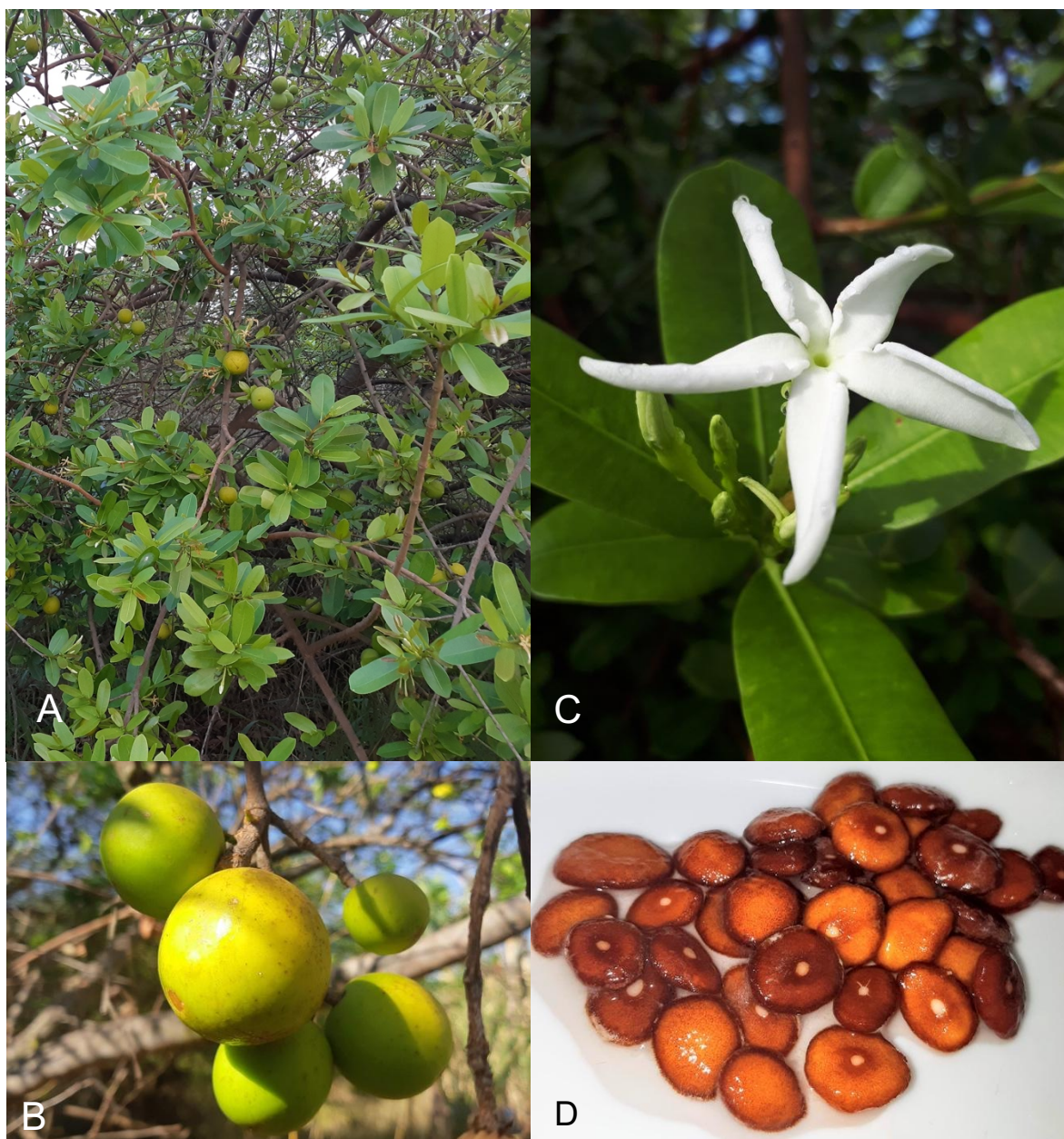


Figura 2.2 *Hancornia speciosa* Gomes: A – Estádio adulto; B – Aspecto morfológico do fruto; C – Flor, D – Aspecto da semente removida do fruto e sem a polpa.

(Fotos: Tiago 2018)

2.2 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO

Os vegetais são um dos seres vivos com as melhores habilidades reprodutivas. Acumulando milhares de anos de adaptação e co-evolução aos animais, fungos e bactérias. Plantas em ambiente natural possuem estratégias de propagação que buscam a sobrevivência da espécie e a expansão da sua territorialidade. Reproduzindo de forma sexuada a planta produz gametas por meio da meiose com a metade de seus cromossomos totais (Griffiths, 2016). Na via assexuada o vegetal realiza a produção de novas células através de mitoses, conservando características agronômicas regenerando um novo indivíduo igual à planta mãe (Fachinello, Hoffmann & Nachtigal, 2005).

Antes do surgimento das flores, a produção de sementes foi o maior avanço evolutivo para as plantas, elas garantiram alta efetividade em levar a prole em longas distâncias. Sendo o meio sexuada de reprodução dos vegetais, esse propágulo pode ser disperso pelo vento, água ou por animais por meio da alimentação dos frutos. Sementes carregam um novo indivíduo gerado a partir da fecundação do óvulo na flor pelo grão de pólen (Kerbaudy 2004).

A vantagem do uso de sementes está na larga escala de plantio que se pode realizar, o manejo e o condicionamento também são fatores positivos, visto que sementes ortodoxas podem ser armazenadas por longos períodos sem perder sua viabilidade de germinação. Na fruticultura, a produção de mudas a partir de sementes tem como finalidade a obtenção de porta-enxertos (Hartmann et al., 2002). De acordo com Fachinello et al. (2005), a propagação por sementes se mostra viável quando não se tem interesse em padronizações de culturas para plantios comerciais.

Com alta capacidade de regeneração de seus tecidos, as plantas têm células meristemáticas que replicam e diferenciam em todos os tipos de células. Sinalizações químicas resultantes das transcrições de genes, produzem hormônios endógenos, que modulam respostas diretamente no meristema. Essas sinalizações ocorrem de acordo com variações de concentração, presença ou ausência de hormônios nos tecidos. Um exemplo é a dominância apical, auxinas realizam a promoção de crescimento em altura e as citocininas

crescimento em largura, em ação sinérgica, esses dois hormônios em um balanço químico nas células, regulam o crescimento (Taiz e Zieger, 2016).

A formação de um broto ou propágulo vegetativo na planta, depende diretamente das ações fitohormonais. De forma natural o vegetal produz novas estruturas para crescimento, floração e em algumas espécies esses novos segmentos da planta podem dar origem a um novo indivíduo completo, geneticamente idêntico a planta doadora do explante. Partes do caule, folhas ou raízes possuem células meristemáticas e tem capacidade de reconstituir uma nova planta conservando os ganhos genéticos em programas de melhoramento. Outra vantagem é a redução do tempo de pré-cultivo até a colheita e permite formação de clones de alta produtividade, gerando uma uniformidade das culturas e a previsibilidade das produções.

A multiplicação de plantas assexuadamente podem conferir resistência a pragas e a fatores abióticos como tolerância à seca (Xavier et al., 2003). As desvantagens da propagação vegetativa estão relacionadas ao estreitamento genético pois, em grandes culturas clonais, o ganho genético entre cruzamentos é nulo. Em grandes culturas frutíferas se utiliza baixa variabilidade de clones e o cruzamento pode ser nulo por auto incompatibilidade. Buscando contornar essa situação, várias unidades clonais diferentes são utilizadas (Wendling 2003).

O tipo de propágulo que será utilizado para a propagação vegetativa influencia no sucesso da técnica, visto que estruturas mais jovens são as mais adequadas. As plantas são bem diversas quanto as respostas fisiológicas a interferências externas como o uso de fitorreguladores para indução de brotações, enraizamentos e demais interesses do pesquisador. A fase fenológica em que a planta está, também é um fator limitante pois, dependendo da idade da planta, estação do ano, clima, temperatura, precipitação, a resposta fisiológica da planta difere (Bergamaschi, 2007).

A propagação vegetativa pode ser realizada por cultivo *in vitro*. A micropropagação, segundo Vasil & Hildebrandt (1965), é um termo usado exclusivamente para referir-se à propagação *in vitro* a partir de alguma parte específica da planta. Bastos et al. (2007) complementam que este processo vai até o enraizamento e culmina na aclimatização da planta produzida *in vitro*. Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que a micropropagação é o princípio básico de todos os outros procedimentos de cultivo *in vitro*, pois dela depende o sucesso da técnica. Este conjunto de técnicas visa a produção de clones

sem contaminação, em curto tempo, utilizando um espaço reduzido (Junghans & Souza, 2009).

As estratégias propagativas têm vantagens e desvantagens para o processo de domesticação e melhoramento das plantas. A utilização de sementes apresenta algumas desvantagens como a dormência, algumas exigem temperatura ou umidade em condições muito específicas. A produtividade da planta precisa ser considerada, as sementes têm variabilidade genética quando obtidas a partir de cruzamentos, portanto podem apresentar desuniformidade produtiva. O tempo de desenvolvimento até a fase produtiva, pode levar anos, dependendo da espécie (Hoffmann et al., 1996), algo que pode ser um problema para pequenos produtores que visam colheitas a curto prazo.

2.2.1 PROPAGAÇÃO POR SEMENTES

O uso de sementes é o meio mais comum e eficaz de propagação de plantas (Cousens, 2008). Entretanto, para programas de melhoramento, não é uma boa alternativa devido à variabilidade genética obtida por cruzamentos vegetais, o que gera desuniformidade na produção. O uso de sementes não garante a conservação de um recurso genético também. Ao ocorrer o cruzamento de duas plantas, cada uma contribui com metade do material genético que, uma vez unidos, formam o genoma da nova planta. Alelos de interesse podem ser perdidos em cruzamentos, produzindo uma nova planta sem o alelo desejado.

Várias formas de dispersão de sementes são observadas, sendo pelo ar (anemocoria), água (hidrocoria), animais (zoocoria), pelo peso (barocoria) ou pela ação da própria planta (autocoria). Levar suas sementes o mais longe possível é a função primária da planta (Cousens, 2008).

Em *H. speciosa*, a propagação sexuada gera sementes categorizadas como recalcitrantes, perdendo a viabilidade muito rápido, além da polpa do fruto da mangabeira fermentar rapidamente assim que cai no chão. A polpa, na maioria dos frutos, tem ação de inibir a germinação e agir como potencializador de dispersão para animais frutívoros, (Gricoletto, 1997). Mas, além da semente ser recalcitrante, a contaminação por fungos e bactérias endofíticas é relativamente alta (Cardoso, 2015). Dessa forma, estratégias de desinfestação das sementes são necessárias para que a propagação seja viável. A técnica

empregada deve remover contaminantes existentes na superfície da semente proveniente de material de campo. Esta é uma etapa imprescindível na cultura *in vitro* (Cid et al., 2010).

2.2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

2.2.2.1 Estaquia

A estaquia é uma técnica que consiste em promover o enraizamento de partes da planta, principalmente ramos jovens. O enraizamento de estacas envolve a regeneração de meristemas radiculares diretamente a partir dos tecidos associados com o tecido vascular, ou a partir do tecido caloso formado na base da estaca, sendo que a indução da regeneração radicular varia entre as espécies, os genótipos e os níveis de maturação das plantas doadoras. Para *Pinus spp.*, é a técnica de maior viabilidade econômica para o estabelecimento de plantios clonais. Para *Eucalyptus spp.*, é a técnica mais difundida entre as empresas florestais (Gomes, 1987; Xavier & Comério, 1996). No entanto, segundo Assis (1997), sua utilização não é viável técnica e economicamente para todas as espécies florestais.

Quanto ao processo de estaquia, Paiva & Gomes (1995) relataram que, após realizada a seleção da árvore-matriz, ela é cortada, visando a produção de brotos que são enraizados em casa de vegetação. As brotações podem ser colhidas no campo, no caso de árvores selecionadas em plantios comerciais, ou no jardim clonal, que é a segunda etapa do processo. As estacas permaneceram na casa de vegetação por um período de 20 a 45 dias, dependendo da região, da época do ano e da espécie envolvida.

Quando as estacas estiverem enraizadas em casa de vegetação, estas são aclimatadas em telados e, em seguida, transferidas para um local de pleno sol, onde completarão seu desenvolvimento e receberão os tratamentos finais antes de serem levadas ao campo. Normalmente, as mudas produzidas por enraizamento de estacas estão aptas a serem plantadas quando atingem de 90 a 120 dias de idade. Por causa das dificuldades de propagação vegetativa encontradas em algumas espécies, principalmente no que envolve material adulto e variação entre genótipos (Assis, 1997), houve a necessidade de serem desenvolvidas as técnicas de micropropagação (Bonga & Von Aderkas, 1992).

A utilização de fitorreguladores como ácido indolbutírico (AIB) na produção de estacas é eficaz pois promove o enraizamento do ramo, tornando-o viável para as demais

etapas de tratamento. O AIB é um dos mais empregados e mais eficientes (Dunn et.al., 1996; Tonietto et.al.,1997; Dutra et.al., 1998), por ser foto estável e ser imune à ação biológica (Hoffmann et.al., 1996; Ono & Rodrigues, 1996). O AIB tem a ação de desdiferenciar o tecido maturo em tecido jovem para que ocorra o enraizamento.

2.2.2.2 Alporquia

A formação das raízes não é nada trivial nos vegetais. Uma complexa rede de sinalizações químicas é estimulada por ações endógenas com influência da temperatura, tropismos, concentração mineral no solo e disponibilidade hídrica (Taiz e Zieger, 2016). Mesmo antes dos grandes avanços científicos na fisiologia vegetal, as pessoas tinham conhecimento empírico sobre as plantas, não se tem conhecimento sobre quando surgiu ou como se chegou ao conhecimento sobre o início do uso das técnicas de propagação vegetativa, os povos indígenas já dominavam as técnicas muito antes da civilização moderna. Os primeiros manuscritos que relatam a propagação vegetativa foram utilizados na China há mais de 2 mil anos, algo que muito provavelmente é bem mais antigo.

Para que os métodos aplicados sejam eficazes, é necessário que o propágulo utilizado consiga regenerar um novo indivíduo totalmente independente. Na alporquia o segmento a ser propagado passa por alguns tratamentos que estimulam a formação de raízes que vão nutrir a planta posteriormente. Primeiro escolhe o ramo a ser propagado, o que varia conforme a espécie, opta-se por ramos mais jovens, eles têm uma maior concentração em tecidos meristemáticos por estarem em crescimento. O tamanho mínimo também varia, segundo a literatura, a instalação do alporque deve ocorrer no mínimo a 20 cm de distância do ápice do ramo. O anelamento é uma importante etapa seguinte, esse processo consiste na remoção de um anel de suber do ramo, nesse tecido temos a presença do floema, com a interrupção da passagem de substâncias, hormônios e demais fotoassimilados não chegam ao ramo, sendo assim possível interferir para a promoção do enraizamento no local. A alporquia é uma técnica promissora para várias espécies como lichia (*Litchi chinensis*) (Smarsi 2008), caju (*Anacardium occidentale*) (Almeida et al., 1995), *Ficus elastica* (Hartmann & Kester, 1990), e várias espécies de plantas ornamentais (Siqueira, 1998).

A utilização de hormônios vegetais na propagação é algo comum, o ácido indolbutírico (AIB) é o mais utilizado, pois ele promove a desdiferenciação dos tecidos vegetais

dando origem a novas raízes. O que varia nas plantas é a concentração utilizada, algumas plantas como a pitangueira (*Eugenia uniflora*) o mais indicado é 6000 mg L⁻¹ (Hossel 2016), macieira (*Malus domestica*) 2000 mg L⁻¹ (Barbosa 1986) e o Kiwi (*Actinidia deliciosa*) utiliza de 1000 a 2000 mg L⁻¹ de AIB (Schuck, 1992). A raiz emerge do meristema caulinar do ramo por meio da sinalização hormonal e fototropismo negativo, o que pode ser feito privando o alporque de luz solar utilizando plásticos de coloração escura e o substrato que prive o contato da luz com o anel recém tratado com a solução de AIB.

Em plantas do cerrado a aplicação de alporquia já foi realizada em algumas espécies como o pequi (*Caryocar brasiliensis*) (Leite, 2006). Em 2013, Norberto observou em seu estudo que a aplicação de extrato de tubérculos de tiririca (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) e AIB 6,0 g L⁻¹ em clonagem da *Cnidocolus quercifolius* Pohl. (faveleira) pelo processo de alporquia, obteve enraizamento satisfatório para propagação. O tratamento que apresentou melhor resposta usou 100% de extrato aquoso de tiririca.

2.2.2.3 Micropropagação

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos vegetais *in vitro* que procura a propagação de plantas a partir de órgãos diferenciados, podendo ser: gemas, embriões ou hipocótilos, partes de órgãos ou simples células, utilizando diversos tipos de meios de cultura, em ambiente estéril, e em condições de crescimento com controle de luminosidade e temperatura. O termo micropropagação deriva destes pequenos fragmentos de tecido vegetal utilizados para o início do estabelecimento *in vitro* e que são denominados explantes (Grattapaglia & Machado, 1998). É uma técnica que oferece excelentes opções para propagação comercial de plantas, possibilitando a obtenção de grande número de indivíduos a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (KYTE & KLEYN, 2010).

Existem três fatores que afetam a regeneração *in vitro*: o genótipo; a fonte de explantes (folha, raiz, caule, meristema etc.) e a condição da cultura (luz, temperatura, vasilhame). O sucesso da iniciação e regeneração da cultura depende da dinâmica correta no estabelecimento de todos esses fatores. Importante também é o entendimento dos processos de hormônios vegetais que controlam o desenvolvimento dos tecidos vegetais. A melhor via para o desenvolvimento de sistemas de regeneração *in vitro* contínua com base

em testes que incluem estes três fatores. O objetivo é obter uma combinação dos melhores indicadores para que o processo seja bem-sucedido (Andrade et al. 2002).

O primeiro e decisivo passo para efetuar a micropropagação é escolher uma planta matriz que apresenta as características de interesse do pesquisador, pois ela será a fonte de todos explantes designados ao processo de propagação *in vitro*. Deste modo, genótipos superiores poderiam ser multiplicados sem alteração na sua estrutura genética (Bertozzo & Machado, 2010). O tipo de explante, bem como a definição de seu estágio de desenvolvimento, é um dos fatores que determinam a capacidade de resposta *in vitro* (Freitag et al., 2012). A escolha do explante deve ser voltada para tecidos que apresentem maior proporção de tecido meristemático, ou que sejam tecidos mais jovens, com maior capacidade de expressar a totipotência (Torres et al., 1998).

A desinfestação, ou seja, a remoção de contaminantes existentes na superfície do explante proveniente de material de campo ou de casa de vegetação, é uma etapa imprescindível na cultura *in vitro* (Cid et al., 2010). As substâncias germicidas são empregadas em diversas situações por agirem em diferentes locais da célula microbiana, eliminando ou impedindo o crescimento dos microrganismos. Porém, o cuidado deve ser tomado na remoção destes produtos para que não haja resíduos no explante. Dentre as substâncias com ação germicida, destacam-se o etanol; os compostos a base de cloro, tais como hipoclorito de sódio e de cálcio; cloreto de mercúrio; peróxido de hidrogênio; alguns ácidos como ácido clorídrico e bases concentrados; isopropanol entre outros (Silva, 2012). Os detergentes são empregados para maximizar o contato das substâncias germicidas com os tecidos (Grattapaglia & Machado, 1998). É aconselhável que o material utilizado na coleta também seja previamente esterilizado ou que seja realizada uma pré-assepsia para evitar contaminações (Junghans & Souza, 2009).

Outras variações no crescimento *in vitro* originam-se de uma interação de fatores externos e internos inerentes, presentes nas células das plantas, bem como de substâncias translocáveis produzidas nas folhas e gemas, como auxinas, carboidratos, compostos nitrogenados, vitaminas, entre outras, sendo tais variações ainda pouco esclarecidas em espécies lenhosas. Embora a maioria dos fatores envolvidos na propagação vegetativa de plantas tenha sido identificada, ainda há carência na compreensão da importância individual, da interação destes fatores no processo de propagação e da fisiologia do processo (Wendling et al., 2003).

Estudos para o estabelecimento *in vitro* e micropropagação foram realizados com espécies frutíferas do Cerrado. Silveira (2015) infere sobre micropropagação *in vitro* de *Eugenia dysenterica* DC. em condições mixotróficas, concluindo que o sistema mixotrófico é superior no momento da formação de novos brotos no que se refere ao maior número de brotos, maior número de folhas por broto e síntese de pigmentos fotossintéticos. Silva (2012) estudou a germinação *in vitro* de *Dipteryx alata* Vogel e *Eugenia dysenterica* DC e observou que o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) completo obteve maiores porcentagens de germinação para sementes de *D. alata*, enquanto o meio ½MS (meio MS com metade da concentração de macronutrientes) é o mais indicado para germinação *in vitro* de sementes de *E. dysenterica*.

Ribeiro et al. (2009) utilizaram a germinação *in vitro* como método para fornecer elementos que superassem a dormência em sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). Os melhores resultados foram obtidos em meio WPM (Santos 2006) suplementado com 25-32 µM de GA₃. Santos et al. (2006), utilizam como explantes segmentos nodais provenientes de plantas obtidas por meio de germinação de sementes *in vitro* de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) obtiveram êxito na cultura destes tecidos, diretamente inoculados em meio WPM.

Na mangaba, estudos de micropropagação realizados por Paiva & Soares (2009), apontaram que o uso de GA₃ em concentrações superiores a 0,2 mg L⁻¹ inibiram a germinação de sementes, porém elevaram a altura média das plantas.

Com o avanço das técnicas de propagação vegetativa de plantas a micropropagação torna-se cada vez mais uma ferramenta importante para programas de melhoramento genético, por meio de técnicas como a embriogênese somática, cultura de órgãos, fusão de protoplastos e cultura de embriões (Ratnieks & Assis, 1997).

2.2.2.4 Cultura de tecidos vegetais de espécies do Cerrado

O cultivo de plantas germinadas *in vitro* é uma etapa importante para a aquisição de explantes juvenis que tenham uma resposta morfogênica satisfatória e livres de contaminação. Segundo Léo et al. (2007), em seu estudo com *H. speciosa* Gomes, os meios de cultura MS; MS + 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado; ½ MS (meio de cultura MS com

metade da concentração de macronutrientes); $\frac{1}{2}$ MS + 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, são eficientes para a germinação *in vitro* de sementes e formação de plântulas normais, sendo que o meio $\frac{1}{2}$ MS acrescido de 2,0 g.L⁻¹ de carvão ativado proporcionou 100% de germinação e bom desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de plântulas da espécie.

Oliveira et al. (2014), estudando *H. speciosa* *in vitro*, aferiram o efeito de diferentes meios de cultura na germinação. Sementes desprovidas do tegumento passaram pelo processo de desinfestação em fluxo laminar imersas em álcool 70% e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo). Posteriormente, as sementes foram distribuídas ao acaso nos tratamentos de T1 - vermiculita, T2 - vermiculita + areia, T3 - vermiculita + areia barrada, T4 - vermiculita + MS, T5 - vermiculita + $\frac{1}{2}$ MS, T6 - areia, T7 - areia barrada, T8 - areia + areia barrada. No que diz respeito à porcentagem de germinação, o tratamento T3 foi o que apresentou maior índice (90%). Para o índice de velocidade de germinação, os tratamentos T1, T2 e T3 (1,37 a 1,46 dias) foram os de maiores médias e estatisticamente iguais. Em relação ao tempo médio de germinação, os resultados indicaram valores estatisticamente iguais para todos os tratamentos (7,37 a 10,32 dias).

Avaliando as respostas morfogênicas de diferentes explantes cultivados *in vitro*, Léo et al. (2005) constataram que a concentração de 1 mg.L⁻¹ de AIA com 0,5; 1 ou 2 mg.L⁻¹ de BAP induz uma boa formação de calos em segmentos caulinares de plântulas de *H. speciosa* germinadas *in vitro* e a concentração de 1 mg.L⁻¹ de AIA combinada com 1 ou 2 mg.L⁻¹ de BAP promove uma boa formação de calos em segmentos nodais, com a proliferação de brotações adventícias após 45 dias. Avaliando a aplicação exógena de poliaminas em calos da espécie, Fráguas et al. (2009) concluíram que estas substâncias não proporcionam aumento no crescimento de calos e que a oxidação promovida por longos períodos de cultivo *in vitro* induz aumento nos níveis de putrescina, molécula que indica degradação de tecidos vivos. Trocas gasosas possibilitadas pela abertura dos frascos na ocasião da renovação do meio de cultura, e pelo tipo de vedação utilizada, podem baixar a concentração de etileno minimizando os efeitos negativos no vigor das plantas.

Sousa et al. (2007) estudaram os efeitos da benzilaminopurina (BAP) nas concentrações 0,0; 1,0; e 2,0 μ M e ácido indolacético (AIA) nas concentrações 0,0; 0,25; 0,50 μ M, isolados e combinados, para estimular a organogênese. Concluíram que a combinação de 1 mg. L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de AIA é a que proporciona melhor resposta organogênica dos explantes de *H. speciosa*. Soares et al. (2007) observaram que

concentrações de 1,0 ou 2,0 μM de BAP promoveram multibrotações em segmentos nodais nesta espécie e induziu a formação de calos na base dos explantes, e o ácido indolbutírico (AIB) induziu, na concentração de 3,0 μM , a formação de raízes em brotações *in vitro*.

Estudos relacionados à rizogênese em brotos de *H. speciosa* tem utilizado auxinas como indutores. Segundo Lemos et al. (2006), adicionar isoladamente AIB, ANA e 2,4-D, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg. L^{-1} , ao meio de cultura MS não foi satisfatório, sendo que o enraizamento ocorreu em apenas dois explantes, após oito semanas de incubação.

Pinheiro et al. (2002) alcançaram 18,39% e 15,23% de enraizamento em propágulos de *H. speciosa*, submetidos ao alongamento e oriundos de explantes basais em meio WPM e $\frac{1}{2}$ MS, respectivamente, suplementado com 0,5 mg. L^{-1} de ANA combinado com 0,1 mg. L^{-1} de BAP, na presença de carvão ativado. Contudo, Grigoletto (1997) obteve maiores porcentagens de enraizamento em meio de cultura $\frac{1}{4}$ Knoop's (61,5%) e $\frac{1}{2}$ MS (58,5%), suplementado com diferentes tratamentos de AIA e BAP.

O aumento da concentração de gás etileno no cultivo *in vitro* corresponde a um dos principais problemas encontrados na propagação *in vitro* de *H. speciosa*, pois essa substância apresenta efeito adverso no desenvolvimento, morfologia e crescimento das plantas, diminuindo a expansão foliar e a regeneração de novos brotos (Biddington, 1992). Pereira Netto e McCown (1999) inferiram que o desenvolvimento de parte aérea da espécie em atmosfera enriquecida com 5 ou 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de etileno resulta em inibição do alongamento de ramos laterais e do ramo principal, e a concentração de 1 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de etileno resulta em redução da ordem de 50% na proliferação de ramos laterais.

3 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO IN VITRO DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

RESUMO

Por seu uso como fonte de alimento e de medicamentos, a conservação da espécie frutífera nativa do Cerrado *Hancornia speciosa* Gomes, conhecida como mangabeira, é de suma importância. Uma das técnicas para atingir este objetivo é o cultivo in vitro. *H. speciosa* possui um elevado número de agentes endofíticos (fungos e bactérias), que estão presentes em todos os tecidos da planta, dificultando o estabelecimento da espécie in vitro. Para o estabelecimento da variedade *gardineri* em laboratório, primeiro coletou-se os frutos de queda, na Coleção de Frutíferas Nativas da Escola de Agronomia da UFG. Frutos maduros foram coletados e as sementes despulpadas selecionando-se 80 sementes para o processo de descontaminação. O protocolo padrão de descontaminação foi utilizado, com álcool 70% por 1 min e depois 20 min em solução de hipoclorito de sódio (2,5 % de cloro ativo). Em seguida, em câmara de fluxo laminar, enxaguou-se as sementes por três vezes com água autoclavada. Dois grupos foram formados: 40 sementes foram abertas e seus embriões expostos, isolados e inoculados em meio de cultura MS; as outras 40 sementes foram inoculadas diretamente em meio de cultura MS. Para testar o efeito do alongamento na redução do período de desenvolvimento in vitro, embriões foram inoculados em tratamentos com 0, 1, 2 e 4 μM de ácido giberélico (GA_3) e posteriormente em um segundo experimento em meio MS com 1,0 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), com concentrações menores de GA_3 : 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 μM . Para a etapa seguinte, realizaram tratamentos para o enraizamento dos novos brotos com ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações 0, 1, 3, 5 e 7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A germinação dos embriões isolados apresentou menos de 5% de contaminação e foi 30% mais rápida quando comparada com a semente. O efeito do GA_3 nos embriões isolados possibilitou o alongamento da planta com 0,8 μM , atingindo 130 mm em 75 dias, reduzindo em mais de 100 dias o cultivo in vitro. No enraizamento, a concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AIB possibilitou mais de 9 raízes por planta e comprimento médio de 54 mm. A climatização das plantas dos tratamentos aconteceu em substrato com 50% de areia e 50% de latossolo vermelho com substrato comercial. Com mortalidade inferior a 10% das plantas, a técnica mostrou eficácia na produção de mudas.

Palavras-chave: cerrado, cultura de tecidos, mangaba.

OPTIMIZATION OF THE IN VITRO ESTABLISHMENT PROTOCOL OF MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

ABSTRACT

Due to its use as a source of food and medicines, the conservation of the native fruit species of the Cerrado *Hancornia speciosa* Gomes, known as mangabeira, is of paramount importance. One of the techniques to achieve this goal is in vitro cultivation. *Hancornia speciosa* has a high number of endophytic agents (fungi and bacteria), which are present in all plant tissues, which makes it difficult to establish the species in vitro. In order to establish one of the varieties of the species, the *gardineri* variety in the laboratory, first the fall fruits were collected in the Collection of Native Fruits of the School of Agronomy at UFG. Ripe fruits were collected and the seeds pulped, 80 seeds were selected for the decontamination process. The standard protocol for decontamination with 70% alcohol for 1 min and then 20 min in sodium hypochlorite solution (2.5% active chlorine). Then, in a laminar flow chamber, the seeds were rinsed three times with autoclaved water. Two groups were formed: 40 seeds were opened and their embryos exposed, isolated and inoculated in MS culture medium; the other 40 seeds were inoculated directly in MS culture medium. To test the effect of stretching on reducing the period of development in vitro, embryos were inoculated in treatments with 0, 1, 2 and 4 μM of gibberellic acid (GA_3) and later in a second experiment in MS medium with 1,0 μM of 6-benzylaminopurine (BAP), with lower concentrations of GA_3 : 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1 μM . For the next stage, treatments were carried out to root the new shoots with indolbutyric acid (IBA) in concentrations 0, 1, 3, 5 and 7 mg.mL^{-1} . The germination of the isolated embryos showed less than 5% of contamination and was 30% faster when compared to the seed. The effect of GA_3 on isolated embryos allowed the plant to elongate with 0.8 μM , reaching 130 mm in 75 days, reducing in vitro cultivation by more than 100 days. In rooting, the concentration of 1 mg.mL^{-1} of AIB allowed more than 9 roots per plant and an average length of 54 mm. The acclimatization of the treatment plants took place in a substrate with 50% sand and 50% red latosol with commercial substrate. With mortality of less than 10% of the plants, the technique showed efficiency in the production of seedlings.

Key word: propagation, tissue culture, mangabeira

3.1 INTRODUÇÃO

A conservação do Cerrado e o fortalecimento da política ambiental promoveram um aumento da demanda por espécies nativas. Este interesse desperta nos programas de recuperação e conservação de ecossistemas a necessidade de rever métodos de propagação de plantas. Estratégias de conservação da biodiversidade envolvem métodos *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies no seu habitat por meio de unidades de conservação. O método de conservação *ex situ* consiste na conservação das espécies fora do seu habitat e deve ser realizado de forma complementar a conservação *in situ*. Para conservação *ex situ* a espécie *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) não permite a criação de um banco de sementes, pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes, o que inviabiliza o armazenamento.

Hancornia speciosa é uma espécie frutífera nativa do Cerrado que se destaca por possuir grande potencial econômico. No último levantamento realizado pelo comitê nacional de abastecimento (CONAB), em 2016 a produção de mangabas rendeu mais de R\$ 589.654,00 mil reais para os extrativistas e produtores, evidenciando que o fruto tem alto potencial de mercado, mesmo que a maioria de sua produção seja de forma extrativista.

Visando facilitar o processo de descontaminação inicial para o estabelecimento *in vitro* da espécie e melhorar o tempo de obtenção de explantes para a fase de multiplicação de novos brotos, este trabalho focou no processo de germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *H. speciosa* var. *gardineri* e no uso de ácido gibelérico para o estiolamento das plântulas obtidas pela germinação *in vitro*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no LabCultive - Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Goiás – UFG, em Goiânia, GO. Sementes de *H. speciosa* com tamanho entre 6 a 10 mm foram removidas de frutos maduros de queda com coloração amarelada com tamanho superior a 35 mm de diâmetro. Estes frutos foram coletados de março a outubro de 2018, de quatro exemplares da variedade *gardineri*, pertencentes à Coleção de Frutíferas Nativas do Cerrado da Escola de Agronomia da UFG, e que apresentavam bom desenvolvimento e sem sinais de danos por pragas ou patógenos.

3.2.1 Comparação na germinação *in vitro* de sementes e embriões isolados

Após a colheita, os frutos foram despulpados em peneira e as sementes lavadas em água corrente. Para a retirada do excesso de mucilagem foi usado papel toalha. Em seguida, foram colocadas para secar à sombra, em temperatura ambiente, por 24 h. Na pré-asepsia, as sementes foram imersas em um bécker com água e detergente neutro (1 gota de detergente neutro / 100 mL de água) e permaneceram por 20 min sob agitação em água corrente. Em seguida, as sementes foram imersas em álcool 70% por 1 min e imersas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), Tween 20 (1 gota / 100 mL de água) e água autoclavada por 20 min. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas a uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, e o tegumento foi removido (Cardoso, 2008). Neste momento, as sementes foram separadas em dois grupos: 40 sementes sem tegumento e 40 sementes para o isolamento de embriões. As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g L⁻¹ sacarose sem adição de reguladores de crescimento. O pH do meio de cultura utilizado foi ajustado para 5,7 – 5,8 antes da adição de gelex (2,2 g.L⁻¹). Os embriões foram removidos em condições assépticas com o auxílio de bisturi número 20 e foram inoculados no mesmo meio de cultura das sementes intactas. Foram utilizados tubos de ensaio com capacidade de 100 mL, preenchidos com 30 mL de meio de cultura e autoclavados a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação das sementes e embriões, cada tubo de ensaio foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C em condição luminosa de 45 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h. O delineamento foi inteiramente casualizado utilizando 40 repetições por tratamento e as avaliações sobre a taxa de contaminação foram realizadas quinzenalmente, durante 45 dias.

3.2.2 Tamanho mínimo do embrião isolado para germinação *in vitro*

A assepsia das sementes ocorreu como no item 3.2.1: frutos despulpados em peneira, pré-asepsia com água e detergente neutro, seguida de imersão em álcool 70% e hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo. Dentro da câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas a uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada e destinadas aos seguintes tratamentos: semente com tegumento (T0), semente sem tegumento (T1), embrião completo (T2), metade do embrião (T3), 1/3 do embrião (T4). Os embriões foram removidos

com o auxílio de bisturi número 20. Sementes e embriões foram inoculados em meio de cultura MS com 30 g.L⁻¹ sacarose sem adição de reguladores de crescimento. O pH do meio de cultura utilizado foi ajustado para 5,7 – 5,8 antes da adição de gelex (2,2 g.L⁻¹). Foram utilizados tubos de ensaio com capacidade de 100 mL, preenchidos com 30 mL de meio de cultura e autoclavados a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação, cada tubo de ensaio foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C em condição luminosa de 45 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h. O delineamento foi inteiramente casualizado utilizando 40 repetições por tratamento e as avaliações sobre a taxa de contaminação, germinação e crescimento foram realizadas quinzenalmente durante 60 dias.

3.2.3 Alongamento das plântulas com ácido giberélico GA₃

A assepsia das sementes ocorreu como no item 3.2.1: frutos despolpados em peneira, pré-assepsia com água e detergente neutro, seguida de imersão em álcool 70% e hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo e lavadas três vezes em água autoclavada. O meio de cultura Murashige e Skoog (MS) foi preparado contendo 30 g de sacarose e 6,5 g de ágar, 0,1 mg de inositol e pH 5,8, auto clavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. O meio foi então retirado da autoclave e resfriado até atingir 50°C; nesta temperatura, o ácido giberélico foi adicionado por meio de filtração a frio com filtro milipore Millex© para uso em seringas descartáveis de 22 μm. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz / 8 h escuro, e temperatura de 25 °C ± 1 °C. No primeiro experimento foram testadas cinco concentrações, em μM: 0,0 (T1); 0,5 (T2); 1,0 (T3); 2,0 (T4) e 4,0 (T5). Com as avaliações do primeiro experimento com GA₃, foi preparado um segundo experimento com as seguintes concentrações, em μM: 0,0 (T1); 0,2 (T2); 0,4 (T3); 0,6 (T4); 0,8 (T5) e 1,0 (T6). O delineamento de ambos os experimentos foi inteiramente casualizado utilizando 20 repetições por tratamento e as avaliações sobre tamanho de raiz e parte aérea foram realizadas quinzenalmente durante 60 dias.

3.2.4 Enraizamento e aclimatização

Broto de *H. speciosa* var *gardineri* obtidos *in vitro* foram induzidos ao desenvolvimento de raízes. As brotações foram transferidas em câmara de fluxo laminar para tubos de ensaio (25 x 2,3 cm) contendo 30 mL meio de cultura. Os tratamentos consistiram em meio WPM, suplementado com cinco diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB), em μM : 0,0 (T1); 1,0 (T2); 3,0 (T3); 5,0 (T4) e 7,0 (T5). O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,7 - 5,8; a incubação foi mantida com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em condição luminosa de $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento foi inteiramente casualizado utilizando 40 repetições por tratamento, avaliando-se a presença ou não de raízes, o número médio e o comprimento médio de raízes, presença ou não de plântulas e sua altura, aos 30, 45, 60 e 75 dias. Para a aclimatização, foram utilizadas dez mudas com pelo menos cinco centímetros de altura, quatro folhas formadas e comprimento de raízes de pelo menos 2 cm. As mudas foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas com água destilada, colocadas em substrato de vermiculita e areia (1:1), sugerido por Oliveira et al. (2012) e mantidas em estufa por noventa dias, sendo regadas com meio MS a cada 7 dias. Verificou-se a porcentagem de sobrevivência das mudas após 90 dias de cultivo.

3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

A normalidade dos dados obtidos para os tratamentos foi testada pelo teste de Lilliefors. Os tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido por teste Tukey. As concentrações de fitorreguladores foram submetidas à regressão polinomial quadrática. Quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos e entre as interações, as médias foram comparadas entre si, pelo teste t de Student. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram conduzidas com auxílio do software Minitab® 18.1 (Medeiros, 2014).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Comparação na germinação in vitro de sementes e embriões isolados

O protocolo de descontaminação possibilitou que 62,5% de sementes e 97,5% de embriões germinaram sem contaminação fúngica e bacteriana. Após 6 dias inoculados, os embriões começaram a germinação; com 8 dias, todos haviam germinado. No tratamento com sementes, a germinação só começou após 10 dias de inoculação, sendo que todas as sementes estavam germinadas no 17° dia. A altura das plantas diferiu, embriões cresceram 26,1% a mais que as sementes, apresentando 115,89 mm enquanto as sementes cresceram 85,60 mm em média. O que pode ser explicado pela germinação mais prematura em relação às sementes.

No uso de embriões em comparação ao uso de sementes, provavelmente o tempo de germinação é menor, pois o contato direto com o meio de cultivo desencadeia as reações químicas mais rápidas a fim da germinação, o que pode ser observado na figura 3.1. O contato direto da luz com o embrião também pode explicar a rápida germinação, visto que os embriões germinam 40% do tempo mais rápido que as sementes. Portanto os embriões germinam com 35% menos contaminação em relação a sementes, e a altura média das plantas advindas de embriões foi maior, demonstrando que o uso de embriões é mais eficaz à propagação.

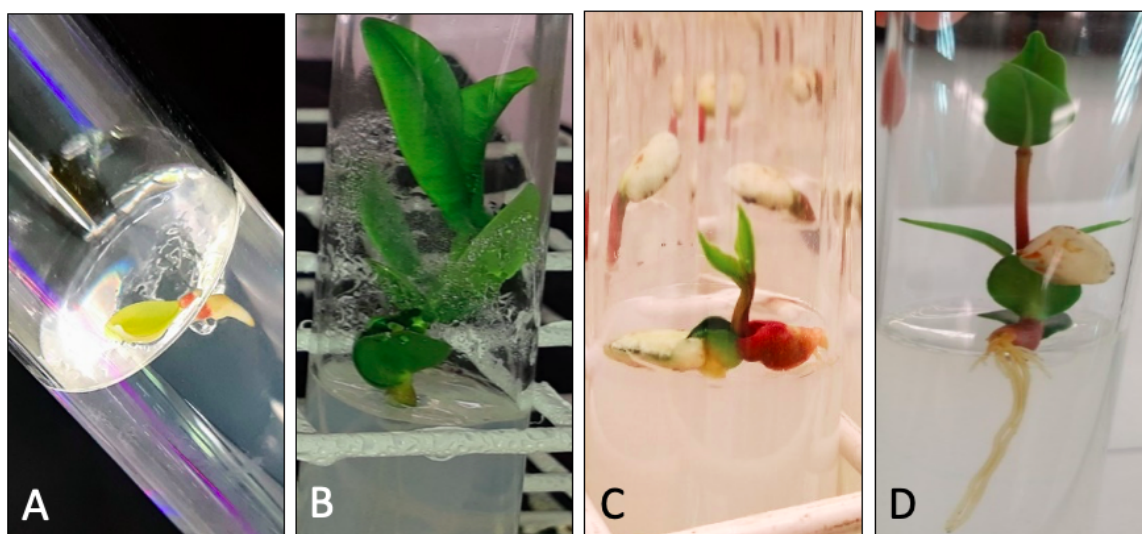


Figura 3.1 – **A** - Embrião de *H. speciosa* var. *gardineri* com 7 dias; **B** - Embrião com 30 dias; **C** - Germinação da semente; **D** - Plântula de semente com 30 dias.

Em seringueira, as sementes também são recalcitrantes, o uso de embriões zigóticos já foi realizado avaliando contaminação e velocidade de germinação (Maciel 2011). No trabalho observou-se que 46,7% dos embriões germinaram com maior velocidade em relação à semente, corroborando os estudos realizados com a mangabeira, obtendo resultados semelhantes. Portanto, considera-se o uso de embriões como o mais eficaz na propagação de mangaba *in vitro*.

3.3.2 Tamanho mínimo do embrião isolado para germinação *in vitro*

Após 90 dias de avaliação, foi possível observar em semente com tegumento e semente sem tegumento, 15% e 5% respectivamente de contaminação, o que nos demais tratamentos não ocorreu. Quanto à germinação e o crescimento, o embrião completo germina e se desenvolve com maior velocidade comparado aos demais tratamentos, apresentando 153,0 mm de tamanho médio. Já o embrião com a metade do tamanho apresentou 140,0 mm em média. No tratamento embrião com 1/3 o tamanho, o crescimento foi de 94,9 mm.

No teste Tukey (Gráfico 3.1) as médias de crescimento dos tratamentos foram semelhantes, evidenciando que o embrião com pode ser excisado até a metade sem afetar o desenvolvimento quanto a germinação e o crescimento. Em *Coffea arabica* (Etiene 2013) o uso de embriões com até 2 mm de tamanho em biorreator foi eficiente. Em mangaba estes resultados permitem explorar técnicas para uma melhor produção de plantas *in vitro*, criopreservação, melhorando as etapas do processo de propagação.

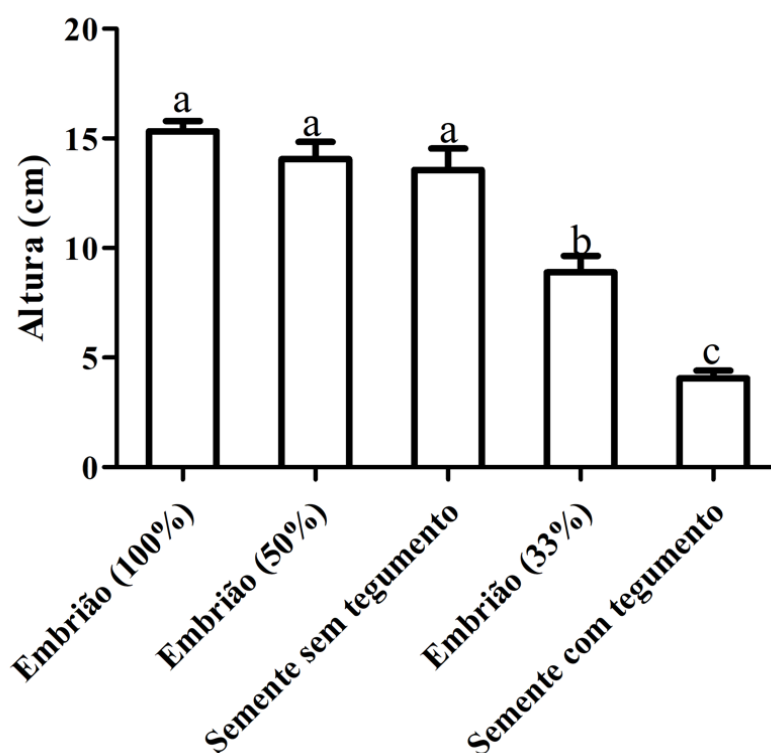


Gráfico 3.1 – Teste de médias para os tratamentos in vitro

Quando o corte é superior a 70% do tamanho total do embrião o desenvolvimento é afetado quanto a germinação e o crescimento; fisiologicamente isso se dá pela dificuldade que o embrião tem em mobilizar os nutrientes dos cotilédones para o escutelo, visto que a maior reserva nutricional está nos cotilédones, a sua remoção total, portanto inviabiliza o desenvolvimento. Para a criopreservação na técnica de *droplet* o tamanho máximo para a produção de sementes sintéticas é de 1,5 mm, esse tamanho é o limite mínimo de corte para os embriões da mangabeira, de acordo com as análises provavelmente é possível a produção de sementes sintéticas de embriões zigóticos, em demais estudos fica necessário verificar a interação do embrião com as substâncias crioprotetoras.

3.3.3. Alongamento das plântulas com ácido giberélico GA₃

Após 60 dias de avaliação, o primeiro experimento realizado com concentrações de 0 a 4 μ M de GA₃, denota diferenças significativas nos tratamentos. Ocorreu 100% de

mortalidade dos embriões em 4 μM e em 2 μM indicando a fitotoxicidade do hormônio em concentrações muito altas (Figura 3.2).

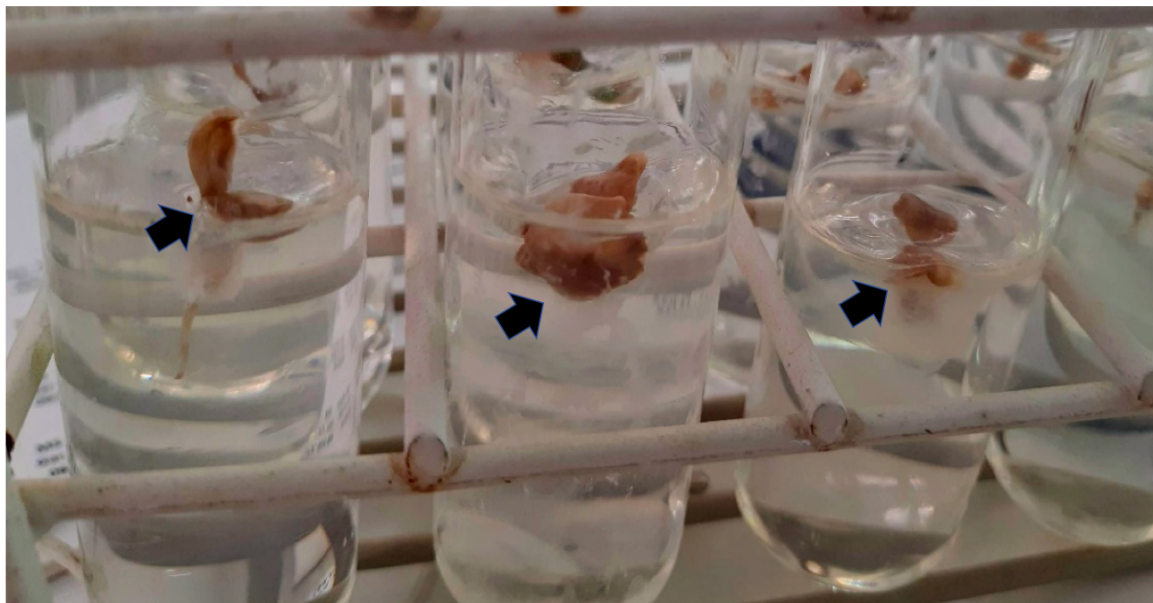


Figura 3.2 - Germinação in vitro em meio MS de embriões isolados de sementes de *H. speciosa* var. *gardineri* em tratamentos com 2 e 4 μM de ácido giberélico (GA^3).

Nos demais tratamentos não houve mortalidade. O maior alongamento das plântulas foi observado em 1,45 μM com altura média de 182,3 mm; no controle - 0,0 μM altura média foi de 85,6 mm, que é o padrão médio para o crescimento da planta (Figura 3.3). No teste Tukey (Gráfico 3.2) o tratamento utilizando 1,45 μM foi melhor comparado ao controle, o que delineou o segundo experimento.

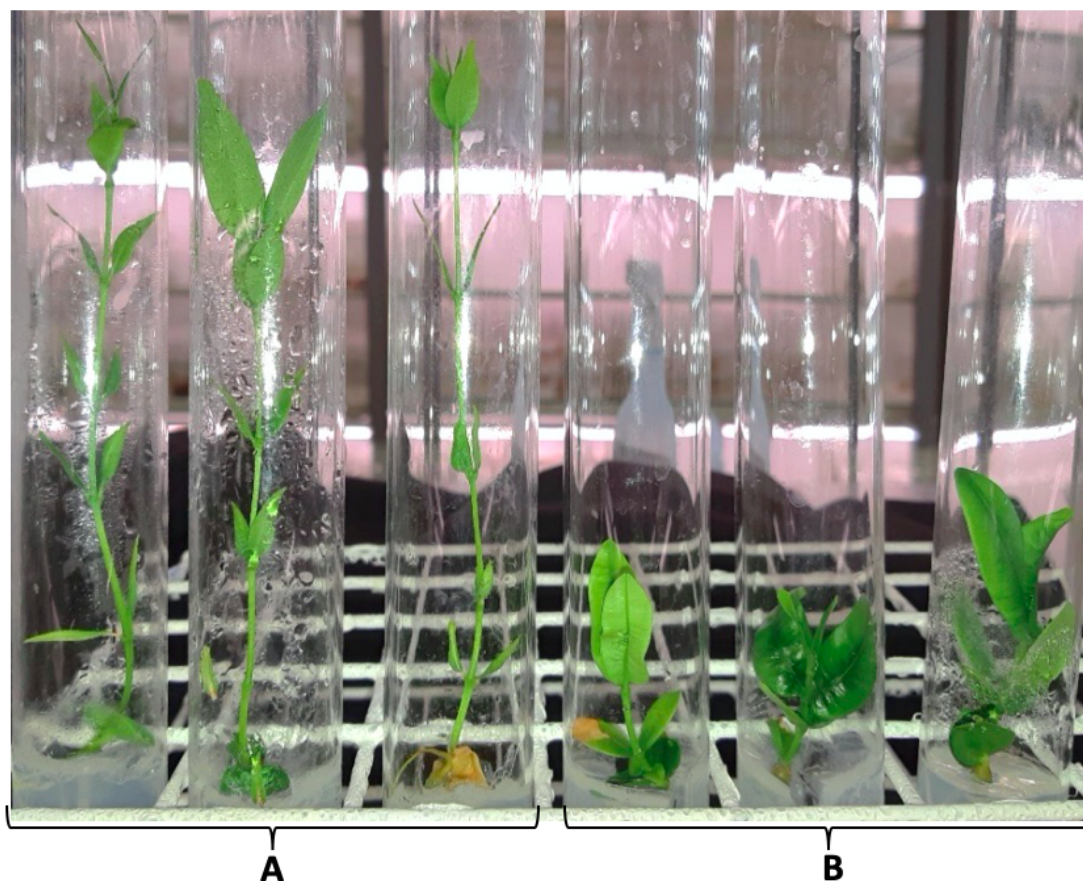


Figura 3.3 – Crescimento de plântulas de *H. speciosa* var. *gardineri* submetidas a diferentes concentrações de GA₃ após 45 dias de germinação em meio MS. (A: T2 0,5 μ M, B: T1 com 0 μ M).

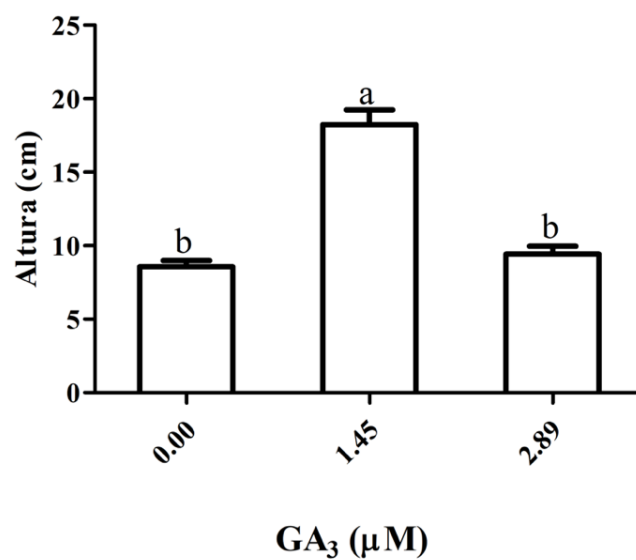


Gráfico 3.2 – Teste Tukey para as concentrações de GA₃

Estes resultados já demonstram que o uso de ácido giberélico pode auxiliar na diminuição do tempo de desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de mangabeira. Para refinar a concentração de ácido giberélico, as concentrações do segundo experimento variaram de 0 a 2,89 μM . Para o comprimento da parte aérea foi observada uma curva de resposta nos tratamentos utilizados. Nos parâmetros estatísticos o teste de médias foi realizado e denota-se que a concentração 2.31 μM demonstrou melhor resposta quanto ao crescimento em relação ao tratamento controle

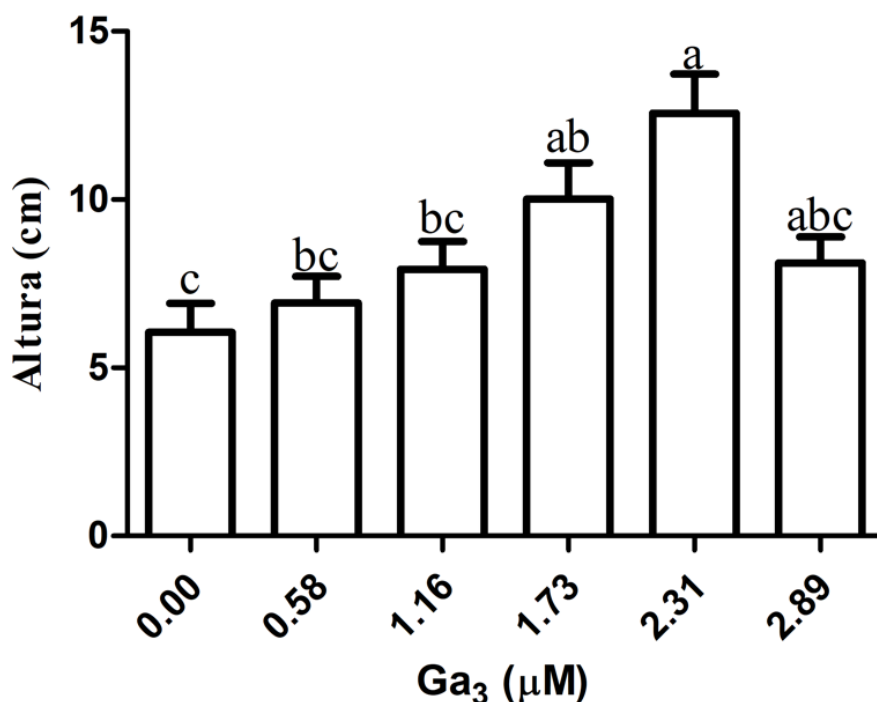


Gráfico 3.3 – Teste Tukey para as concentrações de GA₃ de 0 a 2.89 μM

Os efeitos de ácido giberélico no alongamento da mangabeira *in vitro* é eficaz devendo ser usado em concentrações próximas de 2.31 μM . Os resultados obtidos no experimento com 75 dias evidenciam a hipótese de que o GA₃ pode reduzir consideravelmente o período de cultivo *in vitro* (Figura 3.6).

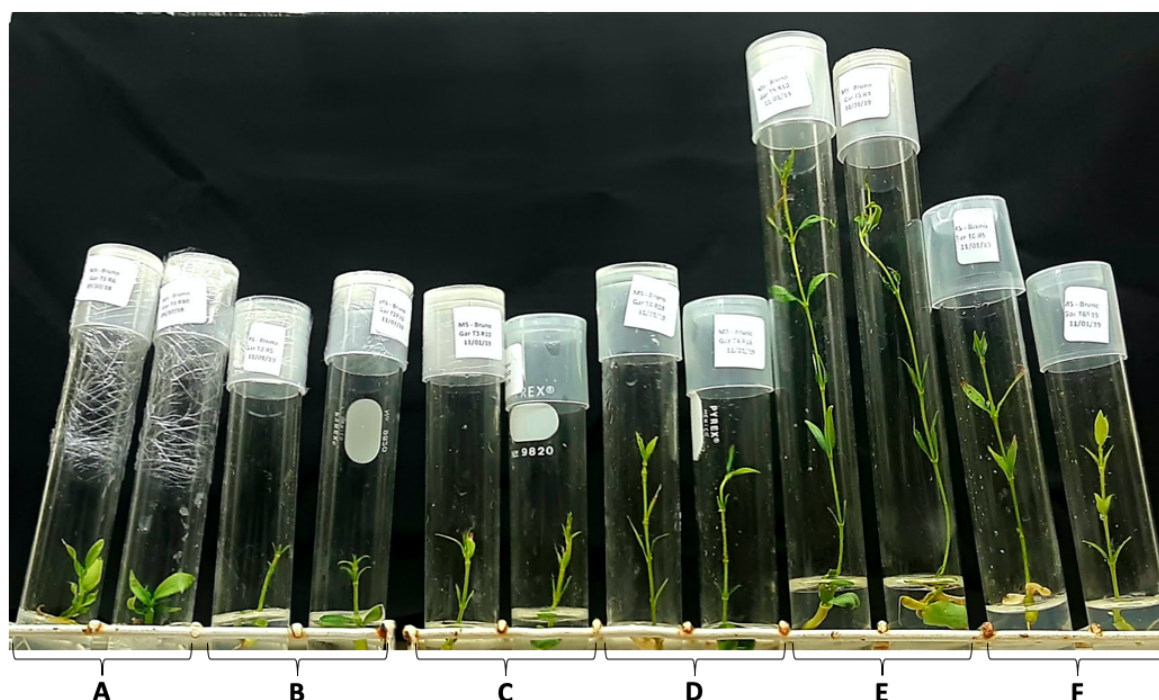


Figura 3.6 – Desenvolvimento in vitro de plantas de *Hancornia speciosa* var. *gardineri* crescendo em meio WPM com diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3). Da esquerda para a direita 2 tubos de cada tratamento, T1- $0,0 \text{ mg. L}^{-1}$ (A), T2- $0,2 \text{ mg. L}^{-1}$ (B), T3- $0,4 \text{ mg. L}^{-1}$ (C), T4- $0,6 \text{ mg. L}^{-1}$ (D), T5- $0,8 \text{ mg. L}^{-1}$ (E) e T6- $1,0 \text{ mg. L}^{-1}$ (F).

Em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa* Deg) o bioativo GA_3 , promove o alongamento da planta em concentrações próximas a $4.62 \mu\text{M}$ (Santos et. Al. 2010) a técnica utilizada foi de borrifagem, o que pode explicar uma dose mais elevada a fim de se obter resultados, como na mangabeira o suficiente foi de $2.31 \mu\text{M}$ estima-se que o contato constante da estrutura vegetal no meio de cultivo suplementado diminua essa necessidade de grandes concentrações, corroborando as evidências observamos que se utilizarmos da concentração que foi utilizada no maracujá ocorre a necrose dos embriões por fitotoxicidade. A indução de primórdios foliares em seringueira (*Hevea spp.*) foi realizada utilizando o GA_3 em $2.16 \mu\text{M}$ (Moreira et. Al. 2012), concentração próxima da utilizada em mangaba. Por serem plantas latexcentes, semelhanças fisiológicas podem ser utilizadas como referência para estudos futuros.

3.3.4 Enraizamento e aclimatização

Após 75 dias de experimento, em cinco tratamentos com o uso de AIB, apenas T1 (tratamento controle com $0 \mu\text{M}$) não apresentou o crescimento de raízes, nos demais

tratamentos a ocorrência foi positiva. Em 4.92 μM o enraizamento ocorreu com vigor, com uma média de 5,90 mm em tamanho e 8,9 raízes por planta. No tratamento de 14.76 μM , o crescimento médio foi de 13,7 mm com 14,42 raízes por planta; 24.6 μM , o crescimento máximo foi de 9,1 mm com poucas raízes formadas, 5,33 raízes por planta em média. No último tratamento 34.44 μM , ocorreu a formação de poucas raízes e poucas repetições responderam ao AIB, o crescimento foi de apenas 2,3 mm em sete das vinte plantas analisadas, com número médio de 4,3 raízes por planta (Figura 3.7). Nos tratamentos com concentrações maiores do que 14.76 μM , as raízes formadas eram frágeis e quebradiças, o que não é interessante em mudas para aclimatização.

O teste Tukey (Gráfico 3.4) foi realizado para as três concentrações que responderam ao tratamento, tratamentos maiores que 24.6 μM a resposta foi negativa. Em 14.76 μM observamos a melhor resposta para a indução do enraizamento *in vitro* da mangabeira.

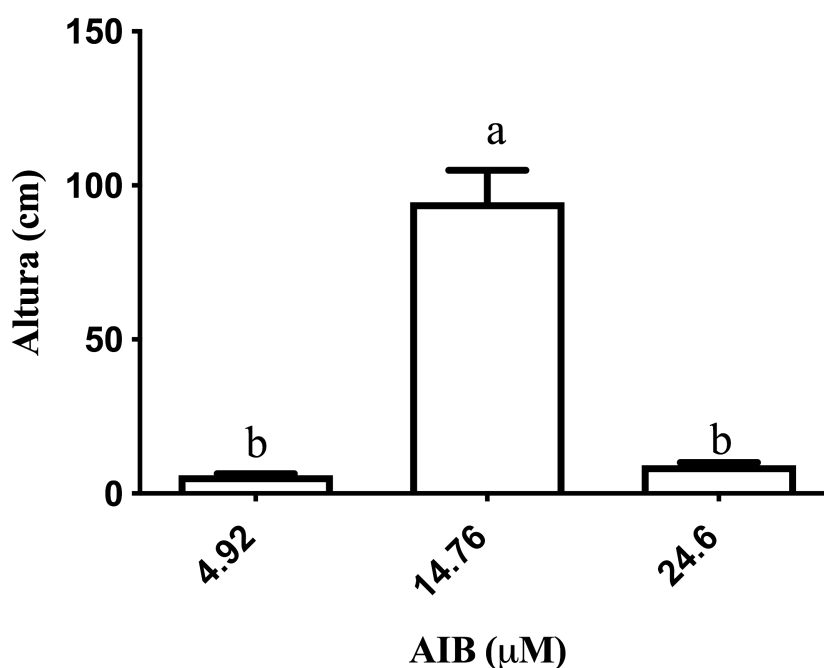


Gráfico 3.4 – Teste Tukey para as concentrações de AIB de 4.92 a 24.6 μM

Em eucalipto (*Eucalyptus urophylla*) foi observado que concentrações entre 2.000 a 5.000 mg L^{-1} de AIB, promoveram o crescimento das raízes e da parte aérea (Lana, 2008). Em estratégias propagativas o uso de auxinas com a função de induzir a produção de raízes é realizada em muitas espécies de plantas, a concentração é algo variável de acordo com a estrutura, diâmetro do ramo e características físico-químicas da planta, porém, os

valores de referência são semelhantes, o que permite delinear estudos avaliando interação dos hormônios com as famílias vegetais.



Figura 3.7 Enraizamento in vitro de plantas de *Hancornia speciosa* var. *gardineri* crescendo em meio WPM com diferentes concentrações de AIB após 90 dias de tratamento. (A) T1 - 0 μM ; (B) T2 - 4.92 μM ; (C) T3 - 14.76 μM ; (D) T4 - 24.6 μM e (E) T5 - 34.44 μM .

Na aclimatização, as plantas selecionadas foram as melhores obtidas no enraizamento. Com o maior número de raízes, e maior tamanho médio. O tratamento T1 não

propiciou nenhum material pois não ocorreu crescimento de nenhuma raiz. Um total de 25 plantas foram obtidas do tratamento (T2) e (T3), que obtiveram os melhores resultados. Ao final de 60 dias de aclimatização obteve-se um total de 18 plantas saudias, apresentando 160,00 mm em média no comprimento final (Figura 3.8). As mudas foram destinadas ao plantio em reflorestamento.



Figura 3.8 Aspecto das mudas de plantas de *Hancornia speciosa* var. *gardineri* crescendo em sacos plásticos para mudas 20 x 25 cm com capacidade para 1 litro com substrato composto de vermiculita e areia (1:1) após 90 dias aclimatizadas em casa de vegetação.

Kozai (1991) já estruturou um ciclo vicioso do controle do ambiente para aclimatização convencional. No qual se estrutura em passos os problemas que podem surgir na aclimatização. Estresse hídrico, umidade relativa alta, sombreamento, substrato utilizado e o manejo nutricional são os principais fatores que impactam de forma negativa na aclimatização. Desde que as plantas tenham boas condições para a autossuficiência as perdas serão menores. No estudo realizado com a mangaba observou-se que a planta é muito sensível a variações ambientais bruscas, como elevação da umidade relativa ou o estresse hídrico.

3.4 CONCLUSÕES

- O tratamento mais indicado para a germinação *in vitro* de *H. speciosa* var. *gardineri* é o uso de embriões isolados. Ocorre menor contaminação e maior aceleração da germinação e desenvolvimento da planta quando comparados a germinação *in vitro* da semente.
- O tamanho do embrião não interfere na germinação, porém, o crescimento em embriões com 1,5 mm de comprimento, é menor em relação aos demais, o que pode ser estimulado por GA₃.
- No desenvolvimento da planta a partir de embriões isolados, o uso de GA₃ proporciona uma aceleração no processo de alongamento da planta *in vitro*, diminuindo o tempo para a seleção e obtenção de gemas para o processo seguinte de multiplicação de novos brotos.
- O uso AIB proporcionou maior tamanho e uniformidade de raízes, na concentração de 14.76 µM.
- A metodologia de desenvolvimento *in vitro*, durante o processo de aclimatização, proporcionou uma sobrevivência de 72% das plantas retiradas da sala de crescimento.

4. ALPORQUIA EM QUATRO VARIEDADES DE MANGABEIRA

(*Hancornia speciosa* Gomes var.: *gardineri*, *speciosa*, *cuyabensis* e *pubescens*)

RESUMO

No melhoramento vegetal, busca-se obter uniformidade e boa produtividade da espécie que passa pelo processo de sermelhorada. No entanto, plantas do Cerrado estão apenas no início do processo de domesticação. A *Hancornia speciosa* Gomes, conhecida como mangabeira, é um exemplo de espécie frutífera do Cerrado que está nesta situação. O extrativismo é a principal forma de exploração de seus frutos. Muito ainda precisa ser estudado para que a espécie se torne uma cultura com sistema de produção desenvolvido, com recomendações de plantio, tratos culturais, controle de pragas e doenças e que promovam o aumento de produção dos plantios. O presente trabalho busca uma alternativa para a propagação vegetativa das variedades de *H. speciosa*, presentes na Coleção de Frutíferas Nativas do Cerrado da Escola de Agronomia da UFG, buscando clonar matrizes bem produtivas da coleção. O estabelecimento de um protocolo de propagação vegetativa, possibilitará que seja realizado o pré-melhoramento. Utilizando jardins clonais de matrizes com caracteres de interesse, pode-se realizar cruzamentos para a obtenção de plantas melhoradas por seleção de progênies. O experimento foi realizado em duas fases fenológicas que a planta possui no ambiente Cerrado, a estação de secas que compreende o período de abril a setembro, e na estação chuvosa que compreende o período de outubro a março. A técnica utilizada foi a alporquia, que consiste em um anelamento completo do ramo na planta matriz utilizando bisturi, removendo o córtex do ramo. Fitorreguladores são utilizados para a indução de enraizamento como o ácido indolbutírico (AIB). Foram testadas 4 concentrações desta auxina: 0, 812,96; 1.016,2; e 1.219,44 mol/L, sendo aplicados 15 ml por ramo. O substrato usado foi solo + substrato comercial umidificado e fixado ao anelamento ramo com um saco plástico preto, privando o local de luz solar. O período de desenvolvimento foi de 180 dias, com umidificação do alporque a cada 15 dias. Os melhores resultados obtidos foram na concentração de 5 mg mL⁻¹ nas quatro variedades utilizadas, porém os resultados em cada variedade foram em períodos diferentes do ano, por conta das fases fenológicas de cada variedade.

Palavras-chave: Propagação vegetativa, mangabeira, melhoramento.

ALPORQUIA IN FOUR MANGABEIRA VARIETIES (*Hancornia speciosa* Gomes var.: *gardineri*, *speciosa*, *cuyabensis* and *pubescens*)

ABSTRACT

In plant breeding, the aim is to obtain uniformity and good productivity of the species being improved. However, Cerrado plants are only at the beginning of the domestication process. *Hancornia speciosa* Gomes, known as mangabeira, is an example of a fruit species from the Cerrado that is in this condition. Extractivism is the basic form of exploitation of its fruits. Much still needs to be studied for the species to become an improved crop, with recommendations for planting, crop management, pest and disease control and increased productivity. The present work seeks an alternative for the vegetative propagation of the *H. speciosa* varieties present in the Collection of Native Fruits of the Cerrado of the School of Agronomy at UFG, seeking to clone very productive matrices of the collection. The establishment of a vegetative propagation protocol will allow pre-breeding to be carried out. Using clonal gardens of matrices with characters of interest, crosses can be performed to obtain improved plants by selecting progenies. The experiment was carried out in two phenological phases that the plant has in the Cerrado environment, the dry season that covers the period from April to September, and in the rainy season that covers the period from October to March. The technique used was layering, which consists of a complete annealing of the branch in the matrix plant using a scalpel, removing the cortex from the branch. Phytohormones are used to induce rooting as indolbutyric acid (IBA). Four concentrations of this auxin were tested: 0, 812,96; 1.016,2 e 1.219,44 mol/L, with 15 ml applied per branch. The substrate used was soil + humidified commercial substrate and fixed to the branching ring with a black plastic bag, depriving the place of sunlight. The development period was 180 days, with the layering humidification every 15 days. The best results obtained were in the concentration of 5 mg.mL⁻¹ in the four varieties used, however the results in each variety were in different periods of the year, due to the phenological phases of each variety.

Keywords: Vegetative propagation, mangabeira, breeding.

4.1 INTRODUÇÃO

O Cerrado forma um hotspot de biodiversidade que inclui, segundo Mendonça et al. (2008), uma quantidade de espécies de plantas ultrapassando a casa dos 12.000, dos quais 4.800 são endêmicas. Além disso, este domínio possui papel fundamental no equilíbrio do clima e de outras vertentes biogeoquímicas não só no Brasil como na América do Sul (MMA, BRASIL 2008). Porém, após avanços nas tecnologias de correção do solo e de lançamento de variedades adaptadas às condições da região Centro-Oeste do Brasil, o Cerrado mostrou ser um lugar promissor para a agricultura, o que acarretou na expansão de 87% da área cultivada entre o ano de 2000 a 2015 segundo (Carneiro Filho et al., 2016), gerando uma perda da cobertura vegetal original de 236 mil Km² de extensão no período. Esse declínio do espaço do Cerrado é preocupante em vista da perda da biodiversidade associada.

A espécie *Hancornia speciosa* Gomes possui uma diversidade fenotípica no Cerrado e é subdividida em seis variedades: *speciosa*, *cuyabensis*, *pubescens*, *gardineri*, *minor* e *maximiliane* (Monachino, 1945). Destas seis, quatro delas estão amostradas na Coleção de Frutíferas Nativas do Cerrado da Escola de Agronomia da Universidade federal de Goiás – UFG: *speciosa*, *cuyabensis*, *pubescens* e *gardineri*. A mangabeira se destaca entre as plantas PANC, pois o processamento de seus frutos já representa uma forma econômica de uso dos recursos naturais do Cerrado (Mota, 2008). Na medicina fitoterápica, o chá da folha é usado para cólica menstrual (Rizzo et al., 1990 apud Almeida et al., 1998) e o súber da raiz é usado junto com o quiabinho (*Manihot tripartita*) para tratar luxações e hipertensão (Hirschmann e Arias, 1990 apud Almeida et al., 1998). Porém, o extrativismo na coleta dos frutos, e a falta de mais pesquisas para a domesticação e melhoramento genético da espécie, impedem avanços no uso sustentável desta frutífera.

A propagação vegetativa é a forma assexuada de multiplicação utilizando de partes da planta como: células, tecidos, órgãos e propágulos dando origem a uma nova planta geneticamente idêntica à planta matriz (Flores, 2006). É uma das técnicas mais utilizadas no mundo pelo fato de que conserva os ganhos genéticos em programas de domesticação e melhoramento genético. Outra vantagem da técnica é a formação de clones de alta produtividade, gerando uma uniformidade das culturas e a previsibilidade das produções. A multiplicação de plantas resistentes a pragas e a tolerância a ambientes específicos também

é um fator positivo (Ivar Wendling et al, 2003). Desvantagens da técnica estão relacionadas ao estreitamento genético, em grandes culturas clonais o ganho de entrecruzamento é nulo. Buscando contornar a situação, várias unidades clonais diferentes são utilizadas.

Um outro problema está relacionado ao tipo de propágulo que será utilizado. As plantas possuem fisiologia complexa, fatores como a idade do vegetal, disponibilidade hídrica e mineral, a fase fenológica e demais fatores bióticos e abióticos interferem diretamente nas respostas fisiológicas (Souza et al., 2006).

A alporquia é uma técnica promissora para várias espécies como lichia (*Litchi chinensis*) (Smarsi 2008), caju (*Anacardium occidentale*) (Almeida et al., 1995), *Ficus elastica* (Hartmann & Kester, 1990), e várias espécies de plantas ornamentais (Siqueira, 1998). A reprodução assexuada ocorre porque células vegetais, quando corretamente estimuladas, possuem a capacidade de regenerar um indivíduo completo, idêntico à planta-mãe, fenômeno conhecido como totipotencialidade (Kerbaui, 1999). Utilizando um substrato úmido, anelando ou não o córtex do ramo, com o uso de fitorreguladores, ou dispensando o uso deles, a alporquia deve ser previamente testada antes de sua implantação em larga escala, pois o método deve ser ajustado conforme a fisiologia da espécie alvo. O método só se mostra eficaz quando o ramo enraíza, podendo ser removido da planta matriz, conseguindo captar de forma autônoma os nutrientes e água necessários para sua sobrevivência (Sasso, 2010).

Este trabalho visa buscar uma metodologia eficiente de propagação vegetativa de quatro variedades da espécie *H. speciosa* Gomes por meio da alporquia. O sucesso na propagação vegetativa desta espécie, é um passo importante no seu processo de domesticação e melhoramento.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Coleção de Frutíferas Nativas do Cerrado da Escola de Agronomia da UFG e no LabCultive - Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, em Goiânia, GO. Ramos semilenhos foram selecionados das quatro variedades de *Hancornia speciosa* presentes na coleção: *Speciosa*, *Cuyabensis*, *Pubescens* e *Gardinieri*.

4.2.1 Alporquia realizada em duas fases fenológicas

O primeiro experimento foi realizado no período de abril a setembro de 2018, na estação de seca para começo das chuvas, visando a baixa incidência de inóculos de fungos no período, fator importante para a sobrevivência dos ramos, pois garante menor mortalidade do alporque após a remoção da planta matriz. O segundo experimento foi realizado no período de janeiro a julho de 2019, na estação de transição das chuvas para a seca na época fenológica de brotação em que a planta está no máximo da formação de estruturas vegetais aéreas e subterrâneas.

Para a seleção das plantas matrizes das quatro variedades observou-se, além da quantidade de ramos novos, o estado fitossanitário das árvores, só sendo selecionadas as que apresentavam baixa incidência de doenças ou ataque de pragas. Quatro matrizes de *H. speciosa* de cada variedade (*speciosa*, *cuyabensis*, *pubescens* e *gardineri*) foram selecionadas e marcadas. Dentro desse grupo de 16 plantas, foram selecionados 4 ramos semi lenhosos com diâmetro entre 15 a 30 mm, e comprimento em torno de 60 cm, coloração verde escuro, com fina epiderme marrom cobrindo o ramo em cada planta. Para cada variedade, o experimento teve um total de 16 repetições.

A técnica da alporquia consiste em um anelamento completo do ramo na planta matriz utilizando bisturi (Figura 4.1), removendo o córtex do ramo. Foi utilizado para a indução de enraizamento, a auxina ácido indolbutírico (AIB), aplicada diretamente na região do corte, nas concentrações de: 0 mg mL⁻¹, 4 mg mL⁻¹ (812,96 mol/L), 5 mg mL⁻¹ (1.016,2 mol/L) e 6 mg mL⁻¹ (1.219,44 mol/L) (Fachinello et al., 2005), preparados em solução de água destilada após dissolução do hormônio em uma solução de NaOH 0,1M, sendo aplicado 15 ml por ramo. O substrato utilizado era composto de 50% latossolo vermelho e 50% substrato comercial, utilizando-se 150 g da mistura, bem umidificada, por alporque. O substrato com AIB era posteriormente fixado sobre o anel do ramo, utilizando plástico preto amarrado com barbante nas extremidades em torno do anel, privando-o de luz solar (Figura 4.1). O período de desenvolvimento foi de 180 dias, com umidificação do alporque a cada 15 dias. Após o período de seis meses, o alporque foi desamarrado para a avaliação do enraizamento. Aferiu-se comprimento e quantidade de raízes e a sobrevivência da planta.



Figura 4.1 Fases da preparação de um alporque em variedades de *Hancornia speciosa* na Coleção de Frutíferas Nativas do Cerrado da Escola de Agronomia da UFG. A) Ramo da mangabaeira *semi-lenhoso*. B) Anelamento exsudando látex. C) Amarra da base. D) Aplicação do hormônio. E) Aplicação do substrato. F) Amarra final do alporque.

4.2.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

Em todos os experimentos o delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado em que cada parcela consistiu em uma árvore. A normalidade dos dados obtidos para os tratamentos foi testada pelo teste de Lilliefors. Os tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido por teste Tukey. As concentrações AIB foram submetidas à regressão polinomial quadrática. Quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos e entre as interações, as médias foram comparadas entre si, pelo teste t de Student. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram conduzidas com auxílio do software Minitab® 18.1 (MEDEIROS, 2014).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Alporquia realizada em duas fases fenológicas

Em setembro de 2018 os resultados obtidos foram insatisfatórios, pois os ramos não demonstraram enraizamento. Porém, a formação de calos foi observada na extremidade do córtex onde ocorreu o corte. Então, foram novamente amarrados e em outubro de 2018, as plantas mudaram sua condição fisiológica e o estado de dormência, em decorrência da mudança de estação seca para a chuvosa. Essa mudança proporcionou o surgimento de raízes, em apenas uma das quatro variedades. A variedade *cuyabensis* foi a única a ter enraizamento nos tratamentos conforme Figura 4.2.

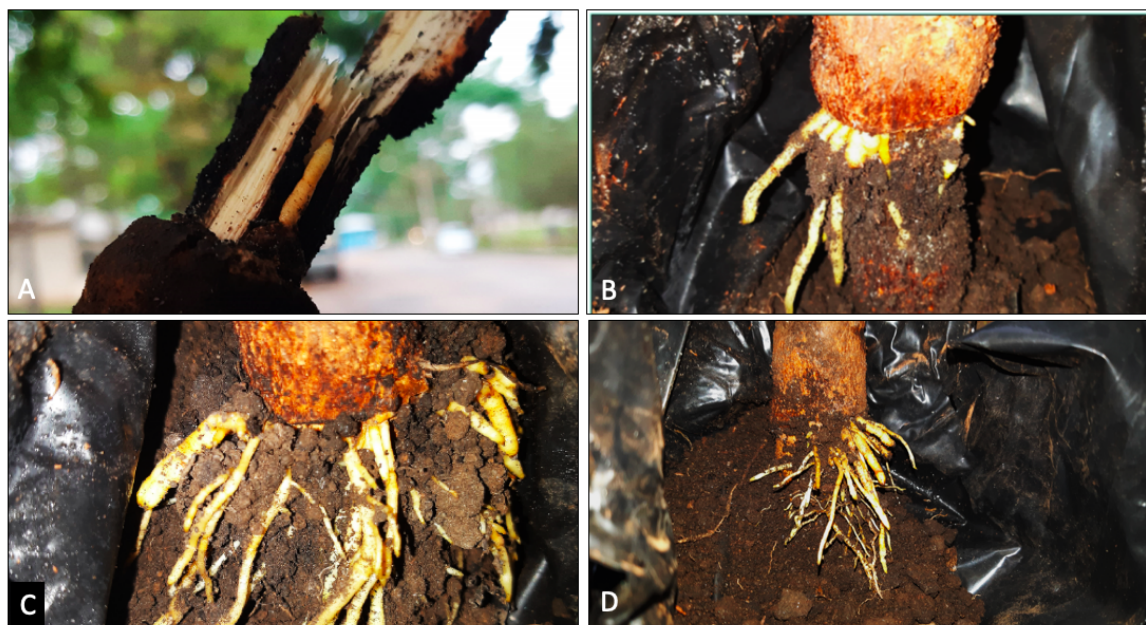


Figura 4.2. Alporquia em ramos de *Hancornia speciosa* var. *cuyabensis* após sete meses de tratamento. **A** - 0 mg mL⁻¹; **B** - 4 mg mL⁻¹; **C** - 5 mg mL⁻¹; **D** - 6 mg mL⁻¹ de AIB.

O experimento teve em média 8,9 raízes por ramo, com comprimento médio de 35 mm no tratamento de 4 mg mL⁻¹ (812,96 mol/L), 32,5 raízes com tamanho médio de 48 mm em 5 mg mL⁻¹ (1.016,2 mol/L) e 21,4 raízes com comprimento de 61 mm em média para 6 mg mL⁻¹ (1.219,44 mol/L). No tratamento controle o enraizamento também foi observado, mas com frequência 90% inferior. Analisado estatisticamente obteve-se o valor de R² =

0,9982 na regressão apresentada na Figura 4.3 abaixo, apresentando significância, com um valor de $p=0,043$.

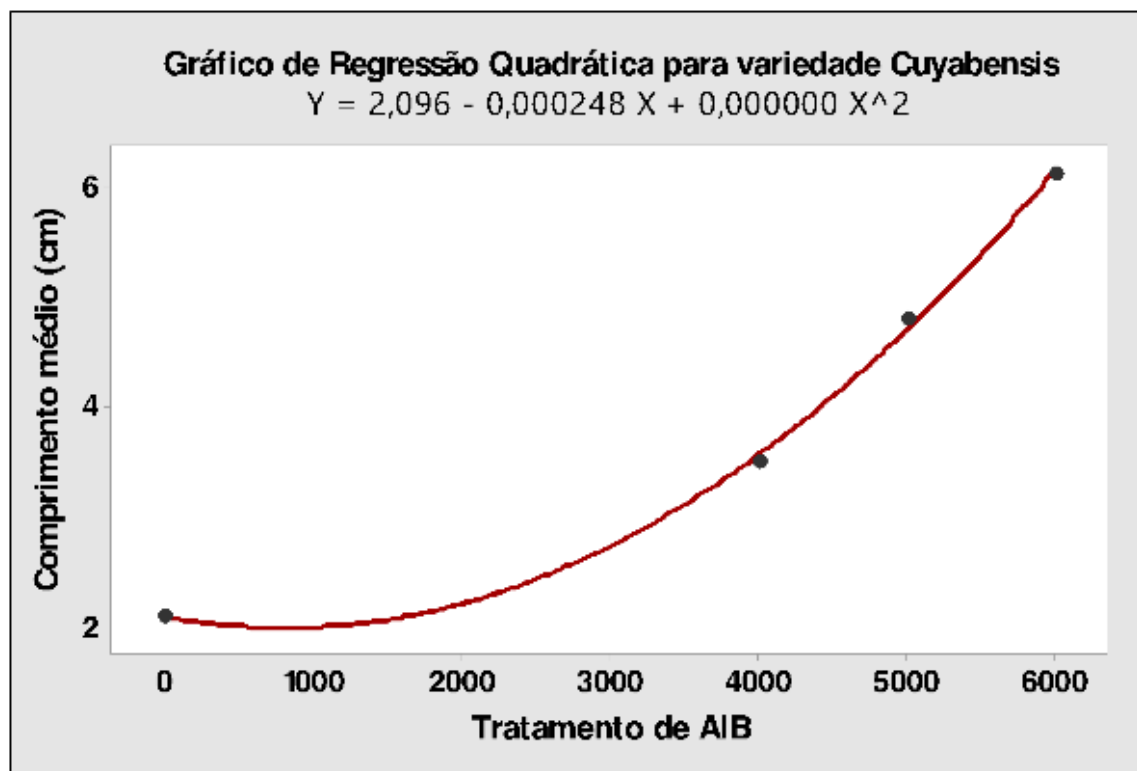


Figura 4.3. Resposta do comprimento médio das raízes em relação a diferentes concentrações de AIB (Regressão Quadrática com $p=0,043$ e $R^2 = 0,9982$), de alporques em ramos de *Hancornia speciosa* var. *cuyabensis* após 180 dias de tratamento.

Em junho de 2019, após 180 dias, o segundo experimento foi desmontado e avaliado. Os resultados foram positivos para as variedades *pubescens*, *gardineri* e *speciosa*, mas, negativo em *cuyabensis*. As plantas responderam aos tratamentos apresentando raízes numerosas no qual a melhor resposta foi da variedade *gardineri*.

Com mais de 50 raízes em média formadas no alporque, a concentração de 5 mg.mL^{-1} , apresentou tamanho médio das raízes de 93,5 mm, enquanto os tratamentos com 4 mg.mL^{-1} e 6 mg.mL^{-1} apresentaram 86,7 mm e 83,1 mm respectivamente. A variedade *gardineri*, teve difícil contagem das raízes, pois estavam muito densas e agregadas ao ramo (Figura 4.4). Analisado estatisticamente obteve-se o valor de $R^2 = 0,9975$ na regressão apresentada na Figura 4.5 apresentando significância, com um valor de $p=0,049$.



Figura 4.4. A - Ramo removido da var *gardineri* após enraizamento, (B) Grande número de raízes emitidas na concentração de 5 mg.mL⁻¹ de AIB.

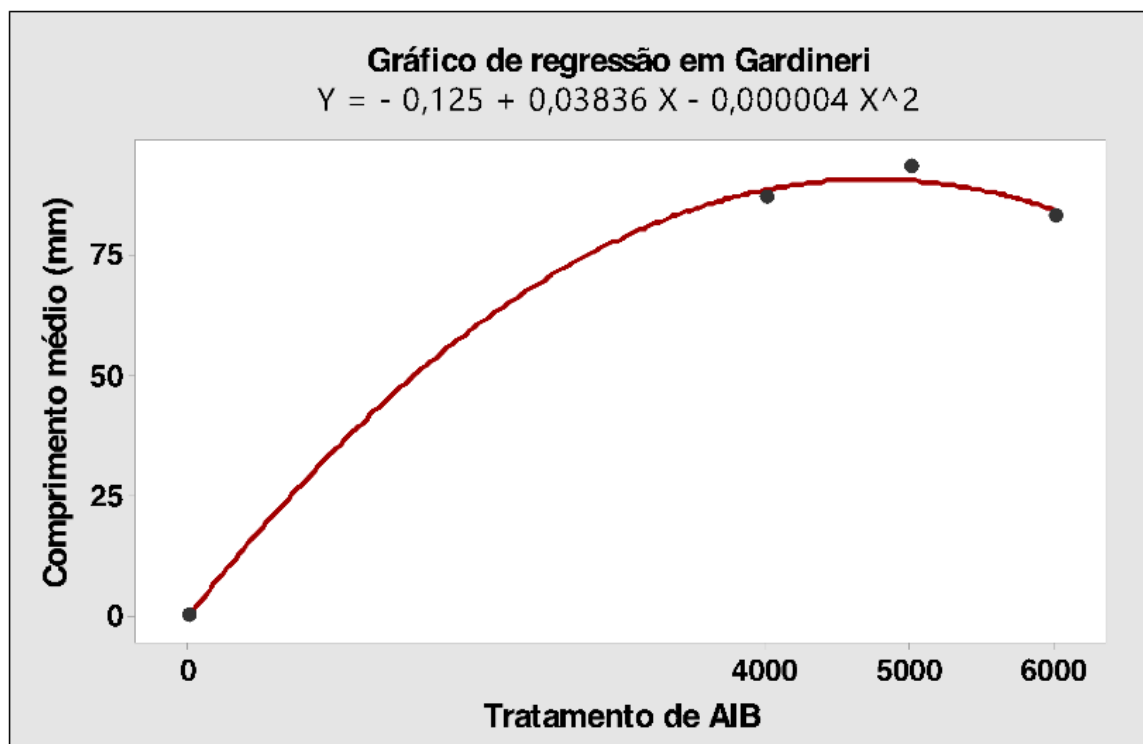


Figura 4.5. Resposta do comprimento médio das raízes em relação a diferentes concentrações de AIB (Regressão Quadrática com $p= 0,049$ e $R^2 = 0,9975$), de alporques em ramos de *Hancornia speciosa* var. *gardineri* após 180 dias de tratamento.

A variedade *speciosa* tem características morfológicas bem diferentes das demais variedades. Embora a espessura do ramo desta variedade seja relativamente menor quando comparada às demais variedades, os resultados dos tratamentos indicaram bom enraizamento. Apenas o tratamento controle não enraizou. Nos tratamentos com AIB a variedade *speciosa* apresentou os seguintes dados: 32,4 mm de comprimento médio e 24 raízes em 4 mg.mL⁻¹; 45,8 mm em 5 mg.mL⁻¹ com 35 raízes, e 29,2 mm de média com 9 raízes em 6 mg.mL⁻¹. Estatisticamente (Figura 4.6) há correlação com um R²= 0,8979, porém o valor de p= 0,32 demonstra que o teste é não significativo. Testes com outras concentrações e outras auxinas podem indicar resultados mais significativos para esta variedade, visto que ele responde à presença de auxinas (Figura 4.7). (4 mg mL⁻¹ (812,96 mol/L), 5 mg mL⁻¹ (1.016,2 mol/L) e 6 mg mL⁻¹ (1.219,44 mol/L)).

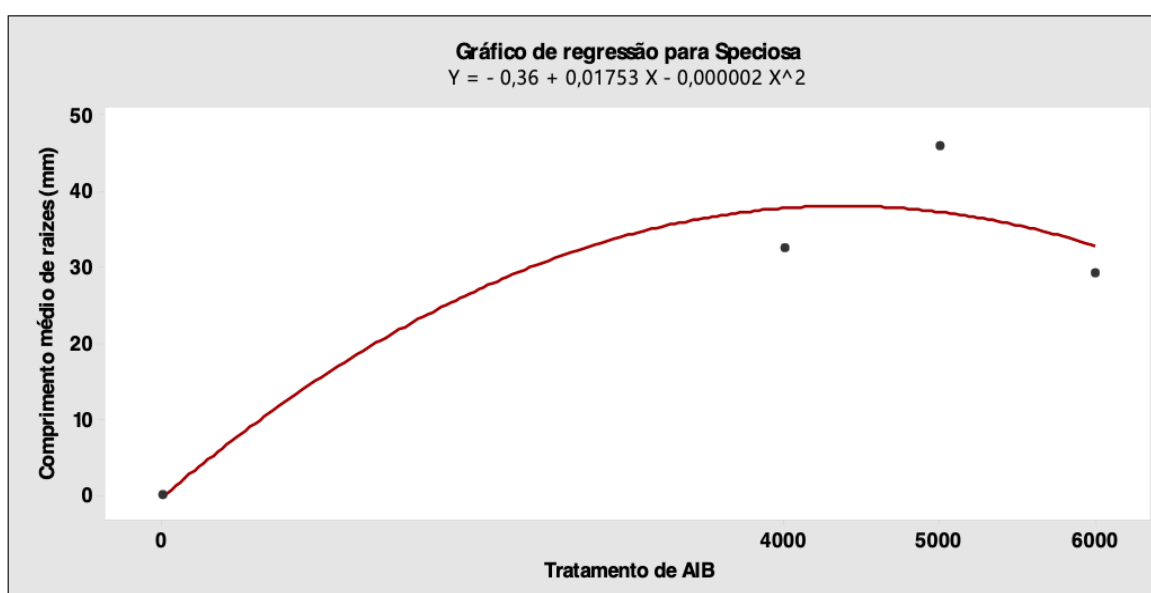


Figura 4.6 Resposta do comprimento médio das raízes em relação a diferentes concentrações de AIB (Regressão Quadrática com $p= 0,32$ e $R^2 = 0,8979$), de alporques em ramos de *Hancornia speciosa* var. *speciosa* após 180 dias de tratamento.

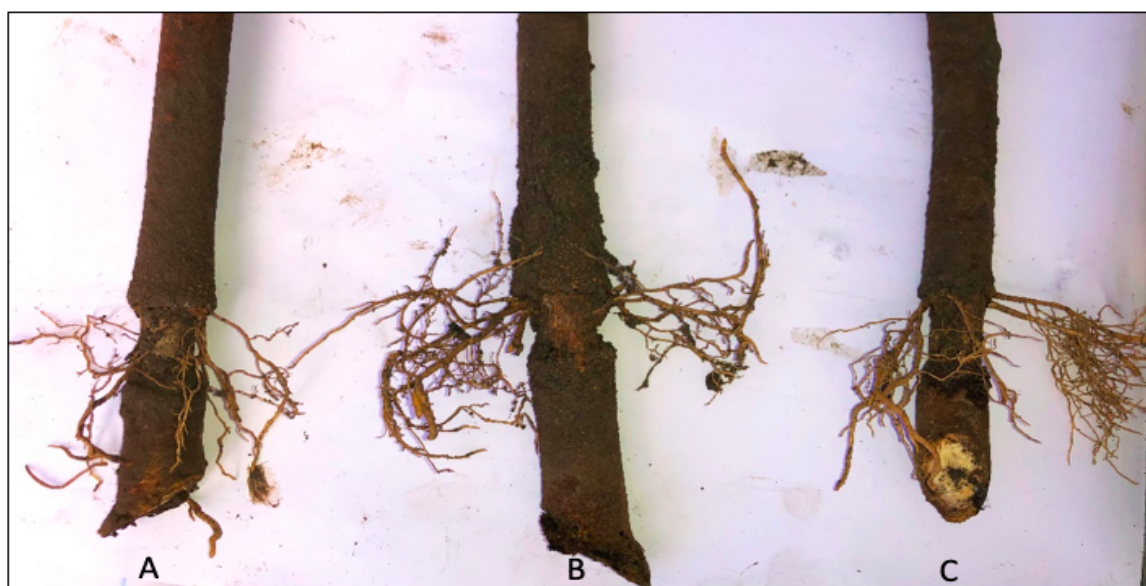


Figura 4.7. Resposta do comprimento das raízes em relação a diferentes concentrações de AIB, de alporques em ramos de *Hancornia speciosa* var. *speciosa* após 180 dias de tratamento. (A) 4 mg.mL⁻¹; (B) 5 mg.mL⁻¹ e (C) 6 mg.mL⁻¹.

Na variedade *pubescens* ocorreu enraizamento em apenas um alporque, na concentração de 5 mg.mL⁻¹ de AIB, com 9 raízes medindo 76,8 mm em média. Nos demais tratamentos não houve enraizamento. Como na variedade *speciosa*, mais testes com novas concentrações e outras auxinas são necessários, visto que é possível o enraizamento. A (Tabela 4.1) mostra o tamanho médio relacionado ao tratamento de AIB aplicado.

Tabela 4.1 Crescimento médio das raízes em função da concentração de AIB

Tratamentos	<i>cuyabensis</i>	<i>gardineri</i>	<i>speciosa</i>	<i>pubescens</i>
0 mg.mL ⁻¹	21,00	0,00	0,00	0,00
4000 mg.mL ⁻¹	35,00	86,70	32,40	0,00
5000 mg.mL ⁻¹	48,00	93,50	45,80	76,80
6000 mg.mL ⁻¹	61,00	83,10	29,20	0,00

Comparando os resultados dos tratamentos, observamos que o tratamento com 5 mg.mL⁻¹ foi o mais eficiente entre as variedades, conforme observado no Teste T de Tukey o valor de $p = 0,026$, embora a variedade *pubescens* tenha resultados apenas para esta concentração. Para estudos futuros, sugere-se esta concentração para a formação de alporques nas variedades de mangabeira do Cerrado.

4.3.2 Aclimatização

A aclimatização do alporque é um fator primordial para verificar se a técnica é eficaz. Neste experimento todos os alporques enraizados foram colocados em saco plástico para mudas 20 x 25 cm com capacidade para 1 litro. O substrato utilizado é o mesmo em que foi realizada a alporquia, sendo umedecidos a cada 48 h, e aplicado 30 mL de solução nutritiva composta por macro e micronutrientes do meio MS a cada 7 dias. Após 20 dias, ocorreu a formação de brotação em todos os ramos. Avaliações a cada 5 dias mostraram crescimento dos brotos de mais de 1,8 cm por dia (Figura 4.8 A). Após 45 dias, observou-se a formação de botões florais em uma muda (Figura 4.8 B). Em 65 dias, o alporque possuía brotos com mais de 20 cm e botões florais prontos para abrir (Figura 4.8 C).



Figura 4.8 – Fase final da aclimatização dos alporques. (A) Primeiros brotos surgindo após 25 dias do plantio; (B) Formação de botões florais em uma muda após 45 dias; (C) Brotos com mais de 20 cm e botões florais prontos para abrir após 65 dias.

Para o estabelecimento *in vitro* os explantes de campo devem ter a menor quantidade de inóculos de fungos e bactérias possível. Nas brotações em alporques mantidos em casa de vegetação, diferentemente do que ocorre com plantas no campo, não foram observados sintomas de contaminação nas folhas ou qualquer sintoma de doenças fúngicas ou bacterianas. A importância de não ocorrer contaminação visível nestas plantas faz com que as técnicas de estabelecimento *in vitro* desse material vegetal sejam mais viáveis.

4.4 CONCLUSÕES

- A alporquia nas variedades de *H. speciosa* do Cerrado é uma técnica de propagação vegetativa viável e eficiente na produção de clones de matrizes selecionadas.
- Para a variedade *cuyabensis*, melhores resultados de enraizamento dos alporques foram obtidos nos meses de outubro e novembro. Para as variedades *gardineri* e *speciosa*, o enraizamento ocorreu nos meses de março e abril.
- A variedade *pubescens*, embora tenha enraizado nos meses de maio e junho, necessita de mais estudos, pois o alporque enraizou apenas na concentração de 5 mg mL⁻¹ (1.016,2 mol/L).
- O AIB auxilia na formação das raízes adventícias. A concentração de 5 mg mL⁻¹ (1.016,2 mol/L), indicou ser a melhor dosagem entre as variedades testadas.

5 REFERÊNCIAS

- ASSIS, T. F. **Propagação vegetativa de Eucalyptus por microestaquia**. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. Proceedings... EMBRAPA, Colombo, 1997. v. 1, p. 300-304.
- ALMEIDA, F.A.G.; ALMEIDA, F.C.G.; MENEZES JUNIOR, J.; CARVALHO, P.R. **Estudo do sistema radicular de plantas de cajueiro-anão (*Anacardium occidentale* L.)** obtidas por alporquia. Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas, v.17, n.1, p.43-56, 1995.
- ALMEIDA, F. de A. C.; MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; GOUVEIA, J. P. G. **Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v.6, n. 2, p.295-302, mai./ago. 2002. ISSN 1807-1929.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Embrapa Cerrados. 1. Ed. Planaltina, DF, 2002. 16 p.
- ARNAO, M.T.G; ENGELMANN, F; CRUZ, C.A. **Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity**. Resources 2013, 2, 73-95; doi:10.3390/resources2020073, june 2013. ISSN 2079-9276.
- BASTOS, D.C.; PIO, R.; SCARPARE FILHO, J.A.; LIBARDI, M.N.; ALMEIDA, L.F.P.; ENTELMANN, F.A. **Enraizamento de estacas lenhosas e herbáceas de cultivares de caquizeiro com diferentes concentrações de ácido indol butírico**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.27, n.1, p.182-184, 2005
- BASTOS, L. P.; MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; ROCHA, M. C.; HANSEN, D.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. S.; Cultivo in vitro de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1122-1124, 2007.
- BERGAMASCHI, H. O clima como fator determinante da fenologia das plantas. In: REGO, C.M.; NEGRELLE, R.R.B.; MORELATTO, L.P.C. Fenologia: ferramenta para conservação, melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos. Colombo: Embrapa Florestas. ISBN 978-85-89281-12-6. Capítulo 16. pp. 291-310. 2007.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, nov. 2010.
- BFG. 2015. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1085-1113.
- BIDDINGTON, N. L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulator**, v. 11, p. 173-187. 1992.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Programa Nacional de Conservação da Biodiversidade. **A Convenção da Diversidade Biológica – CDB**. Coord. geral Bráulio F. S. Dias. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2000. (Série Biodiversidade n. 1).

BRASIL. GOVERNO FEDERAL. 2007. Grupo Executivo Interministerial. **Plano de desenvolvimento territorial sustentável para o Arquipélago do Marajó: resumo executivo da versão preliminar para discussão nas consultas públicas** / Governo Federal, Grupo Executivo Interministerial. Editora do Ministério da Saúde, Brasília. 24p.

BROWSE, P.M. **A propagação das plantas**. 3.ed. Lisboa: Publicações Europa-América, 1979. p.139-141.

BUZÓ, A. de A.; ROSA, C. A. da. **Controle da umidade de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) com solução salina saturada de acetato de potássio e criopreservação em nitrogênio líquido**. In: Congresso de Iniciação Científica, XVI, 2007. Pelotas, RS. Anais... Pelotas: UFPel, 2007, p.13-15.

CARLOS SOUZA, SILVIA DE MELO FUTADA, ANE ALENCAR. -- SÃO PAULO : **O estado das áreas protegidas na Amazônia brasileira: ameaças e pressões às áreas protegidas**, ISA - Instituto Socioambiental ; Belém : Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia (Imazon) ; Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia (IPAM), 2019. 332 Mb ; ePUB

CARNEIRO FILHO A. AND COSTA, K. (2016). **A expansão da soja no Cerrado: Caminhos para a ocupação territorial, uso do solo e produção sustentável** (“Soy expansion in the Cerrado: Forms of territorial occupation, land use and sustainable production”). INPUT, Agroicone. Available at http://www.inputbrasil.org/wp-content/uploads/2016/11/A-Expans%C3%A3o-da-Soja-noCerrado_Agroicone_INPUT.pdf.

CARDOSO, M.C. **Estabelecimento in vitro sob condições Mixotróficas e criopreservação de *Hancornia speciosa* Gomes**. Goiânia, GO, 2015. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2015.

COMÉRIO, J., XAVIER, A., IANELLI, C. M. **Microestaquia: um novo sistema de produção de mudas de *Eucalyptus* na Champion**. In: ENCONTRO TÉCNICO FLORESTAL, 7, 1996, Belo Horizonte. Anais... Piracicaba: ABRACAVE, 1996. 6 p.

C.; STEIN, V. C. Germinação de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes Substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p.1180-1182, 2007.

CID, L. P. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: **Cultivo in vitro de plantas**. 1. ed. Brasília, 2010. cap. 1, p. 15-43.

DIVAKARAN, M.; BABU, K. N.; PETER, K. V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, p. 175-180, 2006.

COUSENS, ROGER; DYTHAM, CALVIN; LAW, RICHARD (6 de março de 2008). **Dispersal in Plants: A Population Perspective**. [S.l.]: Oxford University Press. [ISBN 978-0-19-929911-9](https://doi.org/10.1017/9780199299119)

DOS SANTOS, C. A. C., Vieira, E. L., Peixoto, C. P., Benjamim, D. A., & Dos Santos, C. R. S. (2010). Crescimento inicial de plantas de maracujazeiro amarelo submetidas à giberelina. *Comunicata Scientiae*, 1(1), 29–34.

DUNN, D. E.; COLE, J. C.; SMITH, M. W. **Position of cut, bud retention and auxins influence rooting of Pistacia chinensis**. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p. 105-110, Nov. 1996.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources*, Newsletter, v. 112, n. 3, p. 9-18, 1997.

ENGELMANN, F. **Plant cryopreservation: progress and prospects**. In vitro Cellular e Developmental Biology-Plant, v.40, n.5, p.427-433, september 2004. ISSN 1475-2689.

FACHINELLO, J. C. et al. Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. 2nd ed. Pelotas: UFPEL, 1995. 178 p.

FACHINELLO, J.C. et al. Propagação de plantas frutíferas. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. 221p.

FACHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. **Fruticultura: fundamentos e práticas**. Pelotas: Editora UFPEL, 2007.

FAO - Food and Agriculture Organization. Fruit and vegetable processing. Rome: Agricultural Services Division FAO, 1995. 249p.

FAO. FAO: its origem, formation an devolution 1945-1981. 1981. Disponível em: <Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-p4228e.pdf>>.

FICK, T. A.; BISOGNIN, D.A.; QUADROS, K. M.; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. S. Estabelecimento e crescimento in vitro de plântulas de Louro-pardo. *Ciência Florestal*. v. 17, p. 343-349, 2007.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em Pfaffia glomerata e Pfaffia tuberosa (AMARANTHACEAE)**. 2006, 168 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; LIMA, G. P. P. Avaliação da aplicação exógena de poliaminas no crescimento de calos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 4, p. 1206-1210, Dez. 2009.

FREIRE, K. C. S.; COELHO, G. G.; RUSSO, S. L.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A.S.; SÁ, A.J.; MACHADO, C.A.; Germinação in vitro de embriões zigóticos e aclimação de

plântulas de mangaba oriundas da cultura de embrião (*Hancornia speciosa* Gomes), **Scientia Plena**, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2011.

FREITAG, Â. S.; NERY, F. U.; ROSSI, F. R.; GONÇALVES, A. N. Estudo comparativo entre dois meios de cultura para *Corymbia citriodora in vitro*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 42, n. 2, p. 347-354, jun. 2012.

FRUTICULTURA TROPICAL: espécies regionais e exóticas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p.323-338

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.

GANGA, Rita Maria Devós et al . **Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do cerrado**. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal , v. 32, n. 1, p. 101-113, Mar. 2010 . Available from access on 30 Sept. 2019. Epub Feb 26, 2010.

GOMES, A. L. **Propagação clonal: princípios e particularidades**. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 p. (Série Didáctica, Ciências Aplicadas, 1).

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

HARDING, K.; BENSON, E.; CLACHER, K. **Plant conservation biotechnology: na overview**. Agro-Food Industry Hi-Tech, Milano, v.9, n.1, p.24-29, 1997. ISSN 2035- 4606.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 5 ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1990, 647 p.

HARTMANN, H.T. et al. **Hartmann & Kerster's plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915p.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Propagación de plantas: principios y praticas**. Ciudad del Mexico: Continental, 1990. 810p.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: Ufla/Faepe, 1996. 319 p.

HONG, T.D Y R.H. ELLIS. 1996. **A protocol to determine seed storage behavior**. IPGRI Technical Bulletin No. 1. International Plant Genetic Resources Institute, Roma.

HONG, T.D., S. LININGTON Y R.H. ELLIS. 1998. **Compendium of information on seed storage behaviour**. Vols. I y II. Royal Botanic Gardens Kew, London.

INPE & Funcate. (2017). **Anthropization data: The Cerrado between 2013 and 2015**. Available at <http://combateadesmatamento.mma.gov.br/analises-no-cerrado>.

JUNGHANS, T. G. e SOUZA, A. S. (Org.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 385 p.

KARTHA, K. K.; LEUNG, N. L.; MROGINSKI, L. A. In vitro Growth Responses and Plant Regeneration from Cryopreserved Meristems of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 107, n. 2, p. 133–140, 1982.

KERBAUY, G.B. **Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos**. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI. v. 2, p. 519-531, 1999.

KOZAI, T.; KOYAMA, Y; WATA ABE, I. **Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar free medium under high photosynthetic photon flux**. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.121-127, 1991.

KYTE, L. AND KLEYN, J. 1996. *Plants from test tubes, an introduction to micropropagation*. Portland, OR: Timber Press; 240.

LANA, R,M,Q; LANA A,M,Q; BARREIRA S; MORAIS T,R; FARIA M,V. Doses do ácido indolbutírico no enraizamento e crescimento de estacas de eucalipto (*eucalyptus urophylla*). *Uberlandia: Biosci* v. 24, n. 3, p. 13-18, July/Sept.. 2008

LEDERMAN, I.E.; BEZERRA, J.E.F. Situação atual e perspectiva da cultura da mangaba no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1., 2003, Aracaju - SE. Anais... Aracaju: SBCM, 2003. p. 1-2.

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

LEITE, Germano Leão Demolin; VELOSO, Ronnie Von dos Santos; CASTRO, Ana Carolina Ribeiro de; *et al.* Efeito do AIB sobre a qualidade e fitossanidade dos alporques de influência da Caryocar brasiliense Camb (caryocaraceae). **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p. 315–320, 2007.

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

MACIEL, S. de A.; OLIVEIRA, J. P. de; SILVA, D. A. da; TEIXEIRA, R. B.; RAPOSO, A. **Germinação de sementes de seringueira in vitro a partir de embriões zigóticos**. Acre: Embrapa, 2011. p.2.

MARTINS, G. V. et al. Diversity and genetics structure in natural populations of *Hancornia speciosa* var. *speciosa* Gomes in northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* , 34:(4)1143-1153, 2012.

MEDEIROS, Júlia Freire. **Conservação ex situ e acesso à informação**: Levantamento das amostras de *manihot esculenta* coletadas na região do rio negro -AM, conservadas pela embrapa. Planaltina, DF. 2014.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Ed.) **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, v. 2, p. 407-1279, 2008.

MONACHIHO, J. 1945. A Revision of *Hancornia* (Apocynaceae). *Lilloa* 11: 19-48.

MOTA, Dalva Maria da; SCHMITZ, Heribert; SILVA JUNIOR, Josué Francisco da. Atores, canais de comercialização e consumo da mangaba no nordeste brasileiro. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 121-143, Mar. 2008.

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, July 1962.

NOBERTO, Maria Nilvânia Da Silva; ARRIEL, Eder Ferreira; FREIRE, Antonio Lucineudo De Oliveira; *et al.* Substratos alternativos na clonagem de faveleira (*Cnidioscolus quercifolius*) pela técnica de alporquia. **Agropecuária Científica No Semiárido**, v. 15, n. 1, p. 48, 2019.

OLIVEIRA, K. S.; OLIVEIRA, M. S.; PEREIRA, E. C.; LIMA, S. C.; ALOUFA, M. A. I. **Efeito de diferentes meios de cultura na germinação in vitro de sementes de mangabeira** (*Hancornia speciosa* Gomes). *Revista Árvore*, Viçosa, MG, v. 38, n. 4, p. 601-607, jul.2014.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Botucatu: Unesp/Funep, 1996. 83 p.

PAIVA, H. N., GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG:UFV, 1995. 40 p. (Boletim, 322)

PANIS, B. et al. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. **Plant Science**, Clare, v. 121, n. 1 p. 95-106, Nov. 1996.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, Clare, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PEREIRA NETTO AB DE, MCCOWN BH (1999) **Thermally induced changes in morphology of *Hancornia speciosa* microcultures: evideration of mediation by ethylene**. *Tree Physiol.* 19:733-740.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. **Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado**.

Ciencia Rural, v.41, n.7, p. 1136-1142, jul. 2011.

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

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. **Micropropagação de *Aspidosperma lolyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis.** Revista *Árvore*, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

ROBERTS, E. H. **Predicting the storage life of seeds.** Seed Science and Technology, Zürich, v.1, n.1, p.449-514, 1973. ISSN 0251-0952.

SASSO, Simone Aparecida Zolet; CITADIN, Idemir; DANNER, Moeses Andriago. Propagação de Jaboticabeira por enxertia e alporquia. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 571-576, June 2010.

SCHUCK, E. Propagação do kiwi. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 5, n. 4, p. 13-18, 1992b.

SILVA, J. C. S.; ALMEIDA, S. P. Botanical resources from neotropical savannas. IN SARMIENTO, G. **Las sabanas americanas: aspectos de su biogeografía, ecología y utilización.** Mérida, Venezuela: ULA, p. 126-140, 1990.

SILVA, Livia Cristina. **Germinação, estabelecimento e multiplicação in vitro de *Dipteryx alata* VOGEL e *Eugenia dysenterica* DC., Espécies frutíferas do cerrado.** Goiânia, GO, 2012. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2012.

SILVEIRA, Andreia Alves da Costa. **Criopreservação de ápices caulinares e micropropagação em condições heterotróficas e mixotróficas de *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC.** Goiânia, GO, 2012. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2015.

SIMÕES, A.O.; ENDRESS, M.E. & CONTI, E. 2010. **Systematics and character evolution of *Tabernaemontaneae* (Apocynaceae, Rauvolfioideae) based on molecular and morphological evidence.** *Taxon* 59: 772-790.

SIQUEIRA, D.L. de. **Produção de mudas frutíferas.** Viçosa: CPT, 1998. 74p.

SOARES F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. SILVA, M.; D. R. G.; PAIVA, P. D. O.; CULTURA DA MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes), **Revista Boletim Agropecuário**, Lavras, n. 67, p. 1-12, 2002.

SOARES, A. N. R. et al. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. *Genetic and Molecular Research*, 15(3):1-12, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 720 p.

TORRES, A.C. et al. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, p. 20, 2001.

VASIL, V.; HILDEBRANDT, A. C. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. **Science**, Washington, v. 150, p. 889-892, 1965.

VIANA, S.S; SANTOS, J.U.M; SIMÕES, A.O. **Diversidade taxonômica de Apocynaceae na ilha do Marajó, PA, Brasil**. Rodriguésia, Setembro 2016. Rodriguésia 68(2): 623-652. 2017

VIEIRA NETO, R.D. 1994. Cultura da mangabeira. Embrapa-CPATC, Aracaju. 16p.

VILLACHICA, L.H.; CARVALHO, J.E.U.; MÜLLER, C.H.; DIAZ S.C. & ALMANZA, M. 1996. Frutales y hortalizas promisorios de la amazonia. Tratado de Cooperacion Amazonica, Lima. 344p

XAVIER, A.; WENDLING, I. PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE CEDRO-ROSA POR MINIESTAQUIA . R. Árvore, Viçosa-MG, v.27, n.2, p.139-143, 2003