

ELEQUISANDRA DA COSTA ARARUNA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BARUEIRO (*Dipteryx alata* Vog.)

UBERLÂNDIA  
MINAS-GERAIS-BRASIL

2015

ELEQUISANDRA DA COSTA ARARUNA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BARUEIRO (*Dipteryx alata* Vog.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia,  
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em  
Agronomia – Doutorado, para obtenção do título de  
“Doutora”.

Orientador

Prof. Dr. Berildo de Melo

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A662p  
2015

Araruna, Elequisandra da Costa, 1975-  
Propagação in vitro de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) / Elequisandra da Costa Araruna.  
- 2015.  
66 f. : il.

Orientador: Berildo de Melo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Biotecnologia - Teses. 3. Cultivo in vitro - Teses. 4. Plantas dos cerrados - Teses. I. Melo, Berildo de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

---

ELEQUISANDRA DA COSTA ARARUNA

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BARUEIRO (*Dipteryx alata* Vog.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia,  
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em  
Agronomia – Doutorado, para obtenção do título de  
“Doutora”.

Dr. João Paulo Ribeiro de Oliveira

UFAC

Dra. Eliane Ribeiro Cardoso

Flora/Brasil

Dra. Simone Abreu Asmar

ICIAG-UFU

Prof. Dra. Larissa Barbosa de Sousa

ICIAG-UFU

Prof. Dr. Berildo de Melo  
UFU  
(Orientador)

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**A minha mãe Raimunda Araruna, base da minha formação e quem sempre me incentivou nessa jornada. Aos meus amigos João Paulo e Vanderley, pelo carinho e companheirismo.  
Dedico!**

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho não é resultado apenas de esforço individual, mas de significativas contribuições que colhi durante minha trajetória profissional, acadêmica e social, ao conviver com pessoas que foram fundamentais para essa construção.

Em especial a minha mãe, Raimunda Araruna, muito obrigada pelas palavras, conselhos, afeto e amizade; por estar sempre ao meu lado em todos os momentos difíceis, sempre me incentivado e acreditando no meu crescimento profissional e pessoal; pelo exemplo, educação, apoio, amor incondicional, carinho, amizade eterna, compreensão e incentivo durante toda a minha vida. Mãe a senhora fez, faz e fará sempre parte de minha história! Obrigada por tudo. Te amo!!

Aos amigos “irmãos de coração” João Paulo (O supremo) e Vanderley (O poder) pela amizade e por estarem comigo desde o primeiro fruto colhido até o último ponto escrito. Este trabalho não é meu, é nosso! Amo vocês!

Ao meu pai Antônio, meu irmão Charles e meus filhos, Davi e Lucas pela torcida constante, apoio incondicional e por estarem sempre ao meu lado. Muito obrigada!

À Universidade Federal de Uberlândia, em especial ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, e ao Prof. Dr. Berildo de Melo, pela oportunidade de participar do programa de doutorado e pelo apoio para concluí-lo.

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio essencial no desenvolvimento do curso.

Aos membros da Banca (Dr. João Paulo Ribeiro de Oliveira, Dra. Simone Abreu Asmar, Dra. Eliane Ribeiro Cardoso, Dra. Larissa Barbosa de Sousa), pela disposição em ajudar e pelas contribuições para o engrandecimento deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, que são o motivo dos meus momentos mais felizes e que fazem com que todo esforço valha a pena Janice Gurgel, Paulo, Julio, Adriana, Inez, Anelise e Paula.

À toda equipe do laboratório de Biotecnologia da UFU e companheiros de Pós; Eliane, Larissa, Simone, Hernane e Herick, pelo apoio e companheirismo durante todo o trabalho.

À Deus, meu maior companheiro e amigo nesta caminhada e com certeza o maior responsável por tudo de bom que aconteceu.

.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	<u>I</u>
ABSTRACT.....	<u>II</u>
CAPITULO I.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO GERAL.....	15
2.1 Barueiro .....	15
2.2 Cultura de tecidos vegetais.....	17
2.2.1 Desinfestação .....	18
2.2.2 Estabelecimento .....	19
2.2.3 Multiplicação .....	20
2.2.4 Alongamento e Enraizamento .....	21
REFERÊNCIAS.....	23
CAPITULO II.....	32
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4. CONCLUSÃO .....	44
REFERÊNCIAS.....	45
CAPITULO III.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO .....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
REFERÊNCIAS.....	63



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

TABELA 1. Meios de cultura MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) e WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD ; MCCOWN, 1981) e concentrações de sais utilizados para a morfogênese *in vitro* de barueiros (*Dypterixy alata* Vog.) .....38

TABELA 2. Diâmetro de caule (DC) de plantas de barueiro (*Dipteryxy alata* Vog.) cultivadas em meios MS e WPM, avaliadas aos 120 dias após a inoculação.....39

TABELA 3. Comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CR), número de folhas (NF), massa fresca (MF) e massa seca (MSC) de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) cultivadas em meios MS e WPM, avaliadas aos 120 dias após a inoculação.....39

### CAPÍTULO III

TABELA 1. Concentrações de 6– Benzilaminopurina em meio de cultura MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) para a multiplicação *in vitro* de barueiros (*Dypterixy alata* Vog.).....52

TABELA 2. Concentrações de Ácido naftalenoacético em meio de cultura MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) para a alongamento *in vitro* de barueiros (*Dypterixy alata* Vog.).....52

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

FIGURA 1. Árvore do barueiro (a); Polpa do baru (b); Fruto do barueiro (c); Amêndoa do baru (d).....16

## CAPÍTULO II

FIGURA 1. Máquina de propulsão mecânica para corte de frutos de barueiro.....	36
FIGURA 2. Diâmetro do caule de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.....	40
FIGURA 3. Número de folhas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.....	41
FIGURA 4. Massa fresca de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.....	41
FIGURA 5. Massa seca de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.....	42
FIGURA 6. Comprimento da maior raiz de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.....	43
FIGURA 7. Comprimento da parte aérea de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de meios MS e WPM.....	44

## CAPÍTULO III

FIGURA 1. Comprimento da parte aérea de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de 6– Benzilaminopurina.....	54
FIGURA 2. Comprimento da maior raiz de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de 6– Benzilaminopurina.....	54
FIGURA 3. Número de folhas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de 6– Benzilaminopurina.....	55
FIGURA 4. Massa fresca de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de 6– Benzilaminopurina.....	56
FIGURA 5. Diâmetro do caule de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de 6– Benzilaminopurina.....	56

FIGURA 6. Número de brotos de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de 6– Benzilaminopurina.....	57
FIGURA 7. Comprimento da parte aérea de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de Ácido naftalenoacético.....	58
FIGURA 8. Comprimento da maior raiz de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.....	59
FIGURA 9. Diâmetro do caule de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.....	59
FIGURA 10. Número de folhas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.....	60
FIGURA 11. Massa fresca de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.....	61
FIGURA 12. Massa seca de plantas de barueiro ( <i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.....	61

## RESUMO

ARARUNA, ELEQUISANDRA DA COSTA. **Propagação *in vitro* de barueiro (*dipteryx alata* vog.).** 2015. 66 p. TESE (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.<sup>1</sup>

O Cerrado é o segundo bioma em biodiversidade do Brasil, apresentando grande endemismo vegetal. Nativo deste bioma, o barueiro (*Dipteryx alata* Vog. - Fabaceae), é uma espécie economicamente importante, com mercado incipiente devido à escassez de cultivos comerciais. Isto deixa notória a necessidade de desenvolver e aperfeiçoar subsídios para a domesticação dessa espécie. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições para o estabelecimento, multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* do ápice caulinar (AC) de mudas de *D. alata* cultivadas *in vitro*. Para este fim, no estabelecimento dois meios de cultura (MS e WPM) em diferentes concentrações de sais (25, 50, 75 e 100%) foram analisados. Na multiplicação, foram estudadas quatro concentrações de 6– Benzilaminopurina (BAP) (0; 1; 2; 3 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) e adicionado 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA). No alongamento e enraizamento, que ocorrerem simultaneamente, utilizou-se quatro concentrações de ANA (0; 1; 2; 3 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) juntamente com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Aos 120 dias após inoculação, com a exceção de número de brotos, avaliada apenas na etapa de multiplicação, as características avaliadas foram: Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CP), massa fresca (MF), massa seca (MSC), diâmetro do caule (DC) e número de folhas (NF). O meio MS na concentração original (100% de sais) se mostrou eficiente para o estabelecimento *in vitro* do barueiro, resultando em maior comprimento da raiz de 27,65 cm e número de folhas por planta (26,00). Na multiplicação, concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi a mais satisfatória. Entretanto, concentrações acima podem potencializar a multiplicação. É perceptível a influência do ANA e AIB no alongamento e enraizamento *in vitro*, com melhor CPA de 3,14 cm e CR 15,84 cm. Diante disto, é possível afirmar que o meio MS aumenta a possibilidade de sucesso do estabelecimento *in vitro* de ápice caulinar (AC) de *Dipteryx alata*. Concentrações de ANA menores que 3 mg L<sup>-1</sup> se mostraram favoráveis para o desenvolvimento *in vitro* da espécie, características essenciais para o sucesso da climatização.

**Palavras chave:** Biotecnologia, cultivo *in vitro*, barueiro.

---

<sup>1</sup>Orientador: Berildo de Melo- UFU

## ABSTRACT

ARARUNA, ELEQUISANDRA DA COSTA. *In vitro* propagation of *Dipteryx alata* Vog. 2015. 66 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/ Crop Sciences) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.<sup>1</sup>

Savannah is the second biome in biodiversity in Brazil, presenting great vegetation endemism. *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae), native from this biome, is an economically important species, with an incipient market due to the lack of commercial plantations. This highlights the need to develop and provide the basis for the domestication of this species. Thus, this study determined the best conditions for *in vitro* establishment, multiplication, elongation and rooting of stem tips of *D. alata* plantlets grown *in vitro*. Two culture media (MS and WPM) were evaluated in different salt concentrations (25, 50, 75 and 100%) for plantlet establishment. Four concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) (0, 1, 2, 3 and 4 mg L<sup>-1</sup>) amended with 0.25 mg L<sup>-1</sup> naphthalene-acetic acid (NAA) were studied for multiplication. Simultaneous elongation and rooting were studied with four concentrations of NAA (0, 1, 2, 3 and 4 mg L<sup>-1</sup>) together with 0.5 mg L<sup>-1</sup> IBA. The variables analyzed were: shoot length (CPA), root length (CP), fresh matter (MF), dry matter (MSC), stem diameter (DC) and number of leaves (NF), 120 days after inoculation, with the exception of number of shoots, which was evaluated in the multiplication stage only. The medium MS at the original salt concentration (100%) was effective for the *in vitro* establishment of *E. alata*, resulting in greater root length (27.65 cm) and number of leaves per plantlet (26.0). The concentration of 4 mg L<sup>-1</sup> BAP was the best one for multiplication; however, greater concentrations can boost multiplication. The effect of NAA and IBA were noticeable on *in vitro* elongation and rooting, with best CPA (3.14 cm) and CR (15.84 cm). Therefore, it is possible to state that the medium MS increases the success probability of *in vitro* establishment of stem tips of *Dipteryx alata*. NAA concentrations below 3 mg L<sup>-1</sup> were favorable for *in vitro* development of the species, with essential characteristics for acclimatization success|.

**Keywords:** Biotechnology, *in vitro* cultivation, barueiro.

---

<sup>1</sup>Orientador: Berildo de Melo- UFU

## CAPITULO I

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e diversidade edafoclimáticas associada, o Brasil, terceiro produtor mundial, possui expansão na produção de frutas e rapidamente pode se tornar o maior produtor do setor. Apesar disso, entre janeiro e maio de 2015, a produção brasileira foi de 217 mil toneladas (MAPA, 2015). Não distante a fruticultura consome 27% da mão-de-obra agrícola do agronegócio brasileiro com área cultivada superior a 2,2 milhões de hectares (IBRAF, 2014). Dentre as fruteiras cultivadas, destacam-se laranja, banana e abacaxi, que respondem por 67,0% da produção nacional (IBGE, 2014). Isto deflagra a relevância do setor.

Por outro lado, existem espécies nativas do Brasil que apresentam potencial explorador. Na região do Cerrado, 60 espécies de frutas nativas apresentam potencial comercial, entretanto com uso local, muito pela necessidade de maiores pesquisas para a inserção destas fruteiras no mercado (FAO, 2014). Em se tratando de espécies nativas, como as fruteiras do cerrado, sabe-se que a maior barreira é a propagação semínifera, várias vezes dificultosa devido à heterogeneidade de maturação dos frutos e sementes, as quais por vezes também apresentam algum tipo de dormência (FARIAS et al., 1991; FERNANDES, 2007). Sendo assim, a aplicação da cultura de tecidos vegetais – uma ferramenta da biotecnologia vegetal – pode contribuir para a domesticação e cultivo que consequentemente viabiliza o comércio das espécies nativas com potencial frutífero. Esta técnica biotecnológica conduz a multiplicação sistematizada de plantas; o intercâmbio de material genético; o resgate de germoplasma; a preservação de material ameaçado a redução no tempo da formação de mudas, isentas de pragas e patógenos (MELO, 2000; GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004).

Apesar desta ferramenta ser de grande valia, são poucos os trabalhos realizados com cultura de tecidos para fruteiras nativas do Cerrado (ALMEIDA, 2009). Na contramão disso, o barueiro (*Dipteryx alata* Vog.), árvore (Figura 1a) típica do bioma, é estudado quanto às técnicas de cultura de tecidos vegetais, porém ainda de modo incipiente (PINHAL, 2012). Esta espécie traz benefícios nutricionais, possibilitando diversificação na dieta alimentar, e também apresenta potencial medicinal, ornamental, madeireiro e industrial (ASTUA-MONGE et al., 2004; LAMEIRA et al., 2000), o que a torna uma espécie com grande potencial de mercado.

Dos poucos trabalhos dispostos na literatura sobre o barueiro, há protocolos de desinfestação e estabelecimento de sementes, inoculadas em meio MS (MAMEDES; ARAÚJO, 2010; PINHAL, 2012). Contudo, não se sabe qual o melhor tipo de explante para o procedimento e, tampouco, se o meio de cultura MS é, de fato, o que garante melhor condições de propagação da espécie. Assim, esta pesquisa busca dar maiores subsídios para o cultivo *in vitro* do barueiro.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO GERAL**

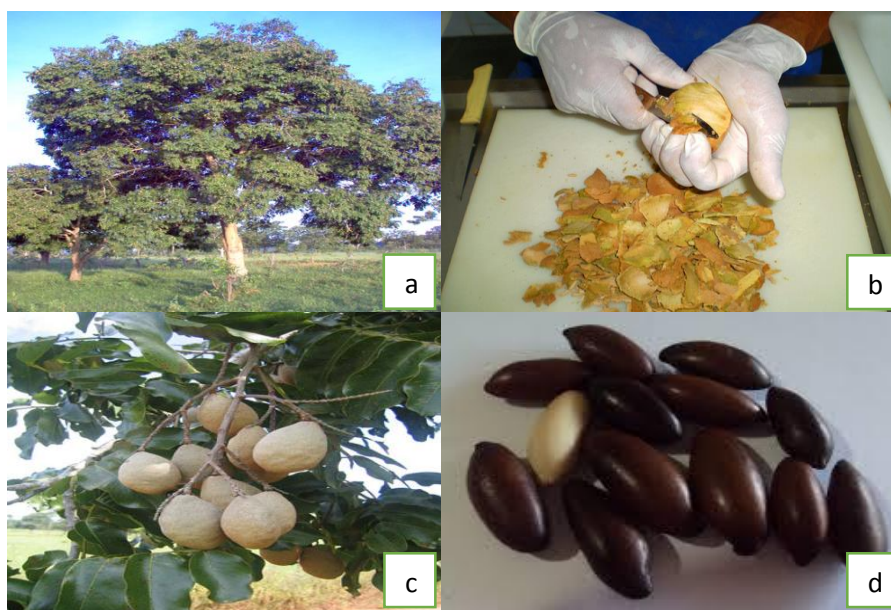
### **2.1 Barueiro**

O barueiro (*Dipteryx alata*) é uma espécie frutífera, nativa na região do Cerrado, que ocorre no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Há relatos de que esta espécie também pode ser encontrada na Bahia, Maranhão, Pará, Rondônia, Piauí e Tocantins, além do norte de São Paulo (CARRAZZA; ÁVILA, 2010; PAGLIARINI et al., 2012). Leguminosae (Papilionoideae), é uma arbórea que alcança até 25 metros de altura (Figura 1a), possui caule com diâmetro entre 40 e 70 cm e madeira de cor clara, compacta, resistente a pragas e com alta durabilidade (SANO et al., 1999). Por estas características, é uma excelente fonte para construção de estruturas externas, construção naval, civil, indústria moveleira e derivados de celulose (LORENZI, 1992; DURIGAN et al., 2011). As folhas são compostas de 6 a 12 folíolos, alcançando até 12 cm de comprimento. Os frutos são legumes de cor parda, com uma semente, quando maduros apresentam queda espontânea, podendo nesse momento ser utilizados para semeadura direta. (LORENZI, 2002; BOTEZELLI et al., 2001).

A espécie possui grande potencial econômico, com diversas possibilidades de utilização no âmbito alimentício, forrageiro, silvicultural, silvipastoril, paisagístico e reflorestamento de áreas degradadas, sendo de grande importância social, econômica e ecológica nas regiões do Cerrado (SIQUEIRA et al., 1986; FONSECA et al., 1994; MORENO et al., 2007). A amêndoa (Figura 1d); (semente) contém aproximadamente 42% lipídios, 23% proteínas, 19% de fibra total e 7,28% de açúcares totais, potássio, ferro e manganês, além de rica em ácidos oléicos e linoleicos, possui alto valor energético, cerca de 560 kcal 100 g<sup>-1</sup>, o que a torna um produto apreciado e interessante para a dieta de animais, humanos e outras espécies (TAKEMOTO et al., 2001; NEPOMUCENO, 2006; VERA; SOUZA, 2009). Em geral, é consumida torrada e tem sabor semelhante ao

do amendoim. (TAKEMOTO et al., 2001). O óleo extraído delas é semelhante ao azeite de oliva, com 81% de insaturação, rico em ômega 6 e 9; composto por ácido oléico (44,53%), linoléico (31,7%), palmítico (7,16%) e esteárico (5,33%), além da vitamina E (13,62 mg 100 g<sup>-1</sup>) (TOGASHI, 1993; TAKEMOTO et al., 2001). Por estas características, o óleo é usado na indústria alimentícia e farmacêutica, como antirreumático, lubrificante para equipamentos, cosméticos e intermediários químicos (ésteres, aminas e amidas) (VALLILO et al., 1990; TOGASHI, 1993; ÁVIDOS; FERREIRA, 2003).

A polpa (Figura 1b) tem sabor adocicado e adstringente, sendo aproveitada na preparação de diversas receitas como geléias, farinhas e licores, com alto teor de carboidratos (63%) e valor calórico de 310 kcal a cada 100 g, é rica em potássio (572 mg 100 g<sup>-1</sup>), cobre (3,54 mg 100 g<sup>-1</sup>) e ferro (5,35 mg 100 g<sup>-1</sup>), destaca-se pelo elevado teor de fibra insolúvel (28,2%) (TAKEMOTO et al., 2001). O alto valor nutritivo impulsionou a comercialização dos derivados dessa espécie, que ganhou espaço a ponto de serem incluídos na complementação da merenda escolar (FERREIRA, 1998; ÁVIDOS; FERREIRA, 2003).



**Figura 1:** Árvore do barueiro (a); Polpa do baru (b); Fruto do barueiro (c); Amêndoa do baru (d).

O fruto (Figura 1c), por amadurecer na estação seca, alimenta várias espécies de animais em época de escassez de alimentos no Cerrado. Por sofrer caducifolia e apresentar folhas ricas em nitrogênio e cálcio, o barueiro contribui para a ciclagem de



nutriente, beneficiando espécies que possuem raízes menos profundas. Deste modo, é classificado como espécie chave do Cerrado (RATTER et al., 2000; VERA; SOUZA, 2009), possuindo aptidão para áreas de reservas legais e de proteção ambiental, além da recuperação de áreas degradadas (AGUIAR et al., 1992; SANO et al., 2004).

A biotecnologia vegetal contribui no avanço tecnológico das atividades direcionadas ao desenvolvimento e transferência para o setor produtivo. Dentre as contribuições, destacam-se as técnicas envolvendo cultura de tecidos (ASTUA-MONGE et al., 2004), principal ferramenta para a produção de mudas em larga escala, com qualidade genética e fitossanitária. Além disso, auxilia na reprodução e multiplicação de materiais em programas de melhoramento genético. Para isto, é imprescindível condições e técnicas adequadas, que possibilitem o desenvolvimento da planta *in vitro*, destacando-se os meios nutritivos e explantes (ANDRADE, 2002).

Os poucos relatos acerca da micropropagação de *Dipteryx alata* são com germinação de sementes *in vitro*, porém com resultados inconclusivos (MAMEDES; ARAÚJO, 2010; PINHAL, 2012). Além disto, trabalhos de biotecnologia vêm sendo feitos com espécies do mesmo gênero, como *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. e *Dipteryx oleifera* Benth., o que pode fornecer informações valiosas (GÓMEZ; ATEHORTÚA, 2013). No entanto, o foco principal destes se dá na produção de células em suspensão, visando extrair substância de interesses farmacocômicos. Em ambas as situações, seja produção de mudas ou de células em suspensão, têm-se como gargalo a determinação do meio nutritivo para a morfogênese *in vitro* do *Dipteryx alata*, considerado etapa primordial para qualquer protocolo de micropropagação.

## **2.2 Cultura de tecidos vegetais**

O cultivo *in vitro* é uma alternativa para a produção em larga escala, em curto período de tempo, de mudas com qualidade. A técnica também auxilia a reprodução e a multiplicação de materiais em programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos. No aspecto de melhoramento, por exemplo, por vezes a técnica permite obter plantas com características desejáveis em período muito inferior ao dos processos tradicionais (ANDRADE, 2002). A utilização desses recursos biotecnológicos, como

técnicas de cultura de tecidos vegetais, tem auxiliado na propagação clonal de genótipos de várias espécies lenhosas, como *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. (GUTIÉRREZ et al., 2011), *Caesalpinia echinata* Lam. (ARAGÃO et al., 2011), *Plathymenia reticulata* Benth. (MOURA et al. 2012), *Amburana acreana* (Ducke) A.C.Sm. (FERMINO JUNIOR ; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012), *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. (CAMPOS et al., 2013) e *Tapirira guianensis* Aubl. (GUTIÉRREZ et al., 2013). Contudo, esta técnica ainda é pouco utilizada para as espécies lenhosas do Cerrado.

Na micropropagação é realizado o cultivo de plantas ou partes destas, também chamados de explantes, em meio de cultura e ambiente asséptico, controlando temperatura, fotoperíodo, umidade e irradiância de luz, em um local apropriado (sala de crescimento); (ERIG et al., 2004; SCHERWINSKI PEREIRA, 2010). É um método de propagação vegetativa amplamente estudado para diversas espécies vegetais, sendo a modalidade mais difundida da cultura *in vitro*. Entre as vantagens da utilização da micropropagação se destacam a possibilidade de obtenção de várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; as melhores condições sanitárias, por meio do cultivo de meristemas para eliminação de pragas e doenças; e a reprodução do genótipo da planta-mãe (ERIG et al., 2004).

Mesmo diante de tantos fatores positivos da micropropagação, pesquisas nesta área com barueiro ainda são bastante escassas. Esta escassez se torna mais preocupante ao se enfatizar que o desenvolvimento de trabalhos de cultivo *in vitro* permite o resgate de germoplasma e a preservação de material ameaçado; a redução no período de germinação, com isenção de pragas e doenças e a uniformização do tamanho das plantas obtidas, inclusive com completo enraizamento (KELLER et al., 2013). Contudo, a primeira etapa desses estudos é o estabelecimento de protocolos eficientes para propagação. Quando esta etapa é bem-sucedida, as demais são realizadas de maneira mais eficiente (GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998).

### **2.2.1 Desinfestação**

O cultivo *in vitro* se inicia com a desinfestação do explante, que é fundamental para continuidade das etapas posteriores (o estabelecimento, determinado pelo

desenvolvimento de primórdios foliares; e, o alongamento e enraizamento) (ROCHA et al., 2008; PINHAL et al., 2012). Cada etapa é realizada por meio de protocolos prévios, estabelecidos para cada tipo de explante e espécie. A contaminação por microrganismos é extremamente prejudicial para o cultivo *in vitro*, causando morte e/ou inviabilizando a utilização das plantas, isto pode ocorrer em todas as etapas deste tipo de cultivo, enfatizando a necessidade do laboratório fornecer condições ideais para prevenção e controle destes microrganismos, o que é feito pelo uso de substâncias específicas e técnicas de cultivo (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

No explante, a descontaminação é comumente realizada por meio do uso de álcool concentrado a 70% da substância pura e a solução de hipoclorito de sódio a 3% da solução comercial, mas a concentração depende do tipo de explante. Ademais, para minimizar a contaminação, faz-se uso do cultivo em frascos que estejam lacrados e esterilizados (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Sabendo que há peculiaridades específicas frente ao uso destas substâncias supracitadas, principalmente pela oxidação dos explantes, faz-se necessário a elaboração de protocolos para cada tipo de explante e de espécie (CID; ZIMMERMANN, 2006). O hipoclorito de sódio é solúvel em água, portanto de fácil remoção, não deixando resíduos. Este produz eficiência na eliminação de fungos e bactérias, diminuindo infecções (NASCIMENTO et al., 2007). Entretanto o uso deste produto depende do binômio tempo e concentração, além do tipo e da idade dos explantes (ANDRADE, 2002).

### **2.2.2 Estabelecimento**

Dos desafios no estabelecimento, a oxidação (escurecimento dos explantes relacionado a liberação de compostos fenólicos) é um dos mais frequentes no cultivo *in vitro* (CARVALHO; VIDAL, 2003). Estes compostos podem ser liberados por zonas do explante que sofreram cortes, o que dificulta a adaptação e o crescimento da planta. Tal problema se agrava quando se trabalha com espécies lenhosas, que são ricas nesses compostos, muito pela produção de lignina (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). Para controle da oxidação é comum a adição de compostos antioxidantes ao meio de

cultivo, como o carvão ativado, a polivinilpirrolidona (PVP) e o ácido ascórbico (GALDIANO et al, 2012).

Apesar de não existir meio de cultivo padrão, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é largamente empregado, com algumas alterações, obtendo resultados satisfatórios para várias espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Altas concentrações de sais no meio MS podem inibir o desenvolvimento da planta *in vitro*, mesmo na presença de auxinas. Portanto, diluições de sais têm possibilitado resultados satisfatórios para muitas espécies (GRATTAPAGLIA ;MACHADO, 1998). Para outras, meios básicos, menos concentrados, como WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), podem ser favoráveis (GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001). De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados na germinação, enraizamento e multiplicação de espécies frutíferas (SOUZA et al., 2013).

### **2.2.3 Multiplicação**

Trabalhos com multiplicação *in vitro* demonstram haver necessidade de adequação de protocolos de micropropagação para a maximização da multiplicação dos explantes (COSTA et al., 2010), sobretudo no que se refere às concentrações adequadas de reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Mesmo para as espécies com protocolo de multiplicação *in vitro* estabelecido, muitas vezes é necessário adequar o balanço hormonal do meio, pois o explante pode ter quantidades variáveis de hormônio. Dentre os reguladores vegetais, a citocinina é utilizada para a divisão celular. O 6-Benzilaminopurina (BAP), citocinina, para induzir a formação de brotos *in vitro* (ALVES et al., 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Estimulam o crescimento pela expansão mais que pelo alongamento (STOYNOVA et al., 2004). Isto ocorre uma vez que esta citocinina é capaz de promover a quebra da dominância apical e da dormência das gemas laterais culminando, assim, com a formação de novos brotos (GEORGE, 1993; LUIS, 2008).

#### 2.2.4 Alongamento e Enraizamento

A rizogênese é uma das fases mais importantes da micropropagação, pois determina indiretamente a sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Durante esta fase é necessário que haja emissão de raízes, base para a sustentação e absorção de compostos inorgânicos da planta (CALDAS et al., 1998; CUNHA, 2003).

Dentre os fatores determinantes na indução de raízes *in vitro*, destacam-se os intrínsecos ao explante (níveis de auxina, juvenilidade da matriz e o genótipo) e os extrínsecos, relativos ao meio de cultura (presença e concentração de reguladores de crescimento, carboidratos, composição mineral, poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos). Soma-se a estes, as condições ambientais do ambiente de crescimento em que as plantas *in vitro* se encontram (ROCHA et al., 2008).

O processo de formação de raízes, com forte influência dos níveis de auxina, se dá nos meristemas (primário e secundário) pelo estímulo da divisão e alongamento celular (FORD et al., 2014). A utilização de elevadas concentrações deste fitormônio no meio pode induzir a formação de calo na base dos explantes (ROGALSKI, 2003), o que é indesejável. Neste sentido, há espécies que enraízam com facilidade e não necessitam da presença deste regulador, o que pode ser explicado pelos elevados níveis endógenos desse fitohormônio (GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998).

Em contrapartida, além da presença e da concentração de auxina no meio, o tempo de exposição também é determinante para o desenvolvimento do enraizamento *in vitro* (NEGASH, 2000; BOSA, 2003). Métodos que empregam altas concentrações de auxina por reduzido período, com posterior transferência das plantas para meio livre de regulador de crescimento, pode promover o enraizamento (HOVÁRTH, 2001).

Além das auxinas, as concentrações de carboidratos (sacarose) adicionados ao meio de cultura influenciam na percentagem de enraizamento e multiplicação *in vitro*. Para porta enxerto de pereira, verificou-se que a maior percentagem de enraizamento foi obtida com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; entretanto foi a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> que promoveu maior comprimento de raízes (LEITE et al., 2000). Santana (2003), estudando o enraizamento *in vitro* em brotações e estacas de Araticum do brejo (*Annona glabra* L.), verificou que os maiores percentuais em meio de cultura com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Por

fim, altas taxas de enraizamento (100%) foram relatadas para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em meio de MS com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (LEITE et al., 2000) .

A concentração de sacarose afeta a assimilação de nutrientes e o efeito de reguladores de crescimento. Além disso, influencia a produção de metabólitos de defesa e de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (KUBO, 2005). Por outro lado, a aclimatização para algumas espécies tem demonstrado efeito positivo. Maior teor de sacarose no meio de cultivo corresponde à maior concentração de carboidratos no tecido foliar. Em consequência, as folhas têm capacidade de permanecer mais tempo na planta (CALVETE, 2002). O aumento na concentração de sacarose do meio de 3% para 5% promoveu aumento de massa em folhas de rosa micropropagadas sob condições heterotróficas ou mixotróficas (ALVES et al., 1998).

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, I.B. de; VALERI, S.V.; ISMAEL, J.J.; ALHO, D.R. Efeitos do espaçamento no desenvolvimento de *Dipteryx alata* Vog. em Jaboticabal-SP, até a idade de 20 anos. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.4, n.2, p.570-572, mar. 1992.
- ALMEIDA, L.F.P. **Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e atemóia (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae**. 2009. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, DF.
- ALVES, A. de A.; REINHARDT, D.H.; A CALDAS, R.C. Manejo e avaliação da soca do abacaxi 'Pérola' nas cond árido de Itaberaba, Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v 3, p. 323-331, 1998.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 14 p.
- ARAGÃO, A.K.O.; ALOUFA, M.A.I; COSTA, L.A. 2011. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne** 17: 339–345. 2011.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p.261-296.
- ASTUA-MONGE, G., FREITAS-ASTUA, J., MACHADO, M. A., **Revista Visão Agrícola** – Citros, Biotecnologia gera produtividade e citros sadios. Pág. 48 USP ESALQ ano 1 jul/dez 2004.
- ÁVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. **Frutos dos cerrados** – preservação gera muitos frutos. 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/bio15/frutos.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2014.
- BOSA, N. Avaliação do crescimento de *Gypsophila paniculata* durante o enraizamento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, 510-3, 2003.

BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata* Vogel (baru). **Cerne**, v. 6, n.1, p. 9-18, 2001.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. E BUSO, J.A.. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**, Volume 1. Brasília - DF: EMBRAPA, v. 1, 1998, p. 133-145.

CALVETE, E.O. et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.186-191, 2002. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010205362002000200014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010205362002000200014&script=sci_arttext)>. Acesso em: 12 out. 2014. doi: 10.1590/S0102- 05362002000200014.

CAMPOS, V.C.A.; LIMA-BRITO, A.; GUTIERREZ, I.E.M.; SANTANA, J.R.F. ; SOUZA, A.V.V. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural** 43: 639–644.2013.

CARRAZZA, L. R.; ÁVILA, J. C. C. **Aproveitamento integral do fruto do baru (*Dipteryx alata*)**. Brasília – DF: ISPN. 2010. 56 p.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Campo Grande: Embrapa, 2003. 42 p.

CID, L. P. D.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2006. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 122).

COSTA, C. J.; SIMOES, C. O.; COSTA, A. M. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Ed 271. Escarificação mecânica e reguladores vegetais para superação da dormência de sementes de *Passiflora setacea* D.C. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010, 16 p.



CUNHA, G. A. P. **Nova tecnologia para o controle da fusariose do abacaxizeiro**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, DEZ 2003.

DURIGAN, G; MELO, A. C. G. de; MAX, J. C. M.; BOAS, O. V.; CONTIERI, W. A.; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado** / Giselda Durigan [et al.]. 3ª ed. rev. e atual. São Paulo : SMA, 2011. 19 p.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e ADAMS, utilizadas como porta enxerto para pereira. **Scientia Agraria**, v.5, n.1-2, p.61-68, 2004.

FAO. The Statistics Division. **FAOSTAT**: core production data. Disponível em:<<http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>>. Acesso em: 01 nov. 2014.

FARIAS NETO, A.L.; FONSECA, C.R.L.; GOMIDE, C.C.C.; SILVA, J.A. Armazenamento de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.13, n.2, p.55-62, 1991.

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. 2012. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal** 22: 1–9.

FERNANDES, R. C. et al. Avaliação do efeito alelopático do coquinho-azedo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, V., 2007, Guarapari. **Revista Brasileira de Agroecologia**. out. 2007. v. 2, n. 2. p.641 – 645.

FERREIRA. R.A. et.al. Caracterização morfológica de fruto, semente, plântula e muda de *Dipteryx alata* Vog –Baru (Leguminosae Papilionoideae). **Cerne**, v.4, n.1, p. 73-87, 1998.

FONSECA, C. E. L.; FIGUEIREDO, S. A.; SILVA, J. A. Influência da profundidade de semeadura e da luminosidade na germinação de sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília - DF, v. 29, n.4, p. 653-659, 1994.

FORD, Y.Y. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v.36, n.2, p.149-159, 2002. Disponível em <[http://www.springerlink.com.w10050.dotlib.com.br/content/ddg65wkrv1xa59qk/?p=de2f551da68545\\_c0a1a69b2b66760b46;pi=13](http://www.springerlink.com.w10050.dotlib.com.br/content/ddg65wkrv1xa59qk/?p=de2f551da68545_c0a1a69b2b66760b46;pi=13)>. Acesso em 12 junho, 2014.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (*Orchidaceae*) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n.5, p. 801-807, 2012.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 1.ed. Dordrecht: Springer, 1993. 574p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 574p. 1996.

GÓMEZ, P. A. M., ATEHORTÚA, L. G., **Choiba culturas de células de *Dipteryx oleífera* Benth.** International Journal of Biotechnology. V.15, n.2, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1990. p. 99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. E BUSO, J.A. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**, Volume 1. Brasília - DF: Embrapa, v. 1, p. 133-145. 1998.

GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 28, p. 355-361, 2004.

GUTIÉRREZ, I.E.M.; NEPOMUCENO, C.F.; LEDO, C.A.S. E SANTANA, J.R. 2011. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural** 41: 260–265.

GUTIÉRREZ, I.E.M.; NEPOMUCENO, C.F.; SILVA, T.S.; FONSECA, P.T.; CAMPOS, V.C.A; ALVIM, B.F.M.; CARNEIRO, F.S.; ALBUQUERQUE, M.M.S. ; SANTANA, J.R.F. 2013. Multiplicação *in vitro* de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae). **Revista Ceres** 60: 143–151.

HOVÁRTH, G. Triacontanol-supported micropropagation of woody plants. **Plant Cell Reports**, v.20, p.16-21, 2001.

IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática – Sidra 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 01 nov. 2014.

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. **Panorama da cadeia produtiva de frutas em 2013 e projeções para 2014**. São Paulo. 127 p.

KELLER, E. R. J.; ZANKE, C. D.; SENULA, A.; BREUING, A.; HARDEWEG, B.; WINKELMANN, T. Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, Mar. 2013.

KUBO, T. et al. Factors affecting the formation and growth of microtubers in *Zantedeschia* plantlets. **Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v.74, n.1, p.47-50, 2005.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C.; PINTO, J. E. B. P. **Documentos 66**. Cultura de tecidos: Manual. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2000, 41p.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH x F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, 2000.

LLOYD, G. and B. MCCOWN. 1980. **Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel**, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 34:420-427.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. v.1. 2002, p. 217.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

LUIS, Z.G. **Propagação *in vitro* e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonima basiloba* Juss. Malpighiaceae)**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, DF.

MAMEDES, T., ARAÚJO, S., Cultivo *in vitro* de explantes de *Dipteryx alata*. **Anais do VIII Seminário de Iniciação Científica e V Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação** Universidade Estadual de Goiás. p 10. 2010.

MAPA:[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/Pasta%20de%20Junho%20%202015.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Pasta%20de%20Junho%20%202015.pdf).

MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da gabirobeira (*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.)**. 2000. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, MG.

MORENO, M. A.; TARAIZI, R.; DEFAVARI, G. R.; FERRAZ, E. M.; MORAES, M. L. T.; CANUTO, D. S. O; GANDARA, F. B.; CIAMPI, A.Y.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de *Dipteryx alata* Vog. em uma população natural do município de Campina Verde MS. In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia. **Anais ... Águas de Lindóia**, 2007.

MOURA, L.C.; TITON, M.; MIRANDA, N.A.; MOREIRA, T.P. ; OLIVEIRA, M.L.R. 2012. Multiplicação e alongamento *in vitro* de vinhático (*Plathymenia reticulata*). **Scientia Forestalis** 40: 499–505.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 141-143, 2007.

NEGASH, A. *In vitro* regeneration and micropropagation of enset from Southwestern Ethiopia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.62, p.153-8, 2000.

NEPOMUCENO, D. L. M. G. **O extrativismo de baru (*Dipteryx alata* Vog) em Pirenópolis (G0) e sua sustentabilidade**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável).

PAGLIARINI, M. K.; FELICIANO, M. E.; CASTILHO, R. M. M. Superação de dormência em sementes de baru. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 5, p. 19-22, 2012.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.

PINHAL, F. H. **Estabelecimento *In Vitro* do Baruzeiro (*Dipteryx alata* vog.)** 2012. 63f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, MG.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. A. B. Estudo preliminar da distribuição das espécies lenhosas da fitofisionomia Cerrado sentido restrito nos Estados compreendidos pelo Bioma Cerrado. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v. 5, p. 5-43, 2000.

ROCHA DA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA S. A.; LEDO C. A. S.; MOREIRA, M. J. S. ; LUCIMÁRIO PEREIRA BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2008, vol.30, n.3, p. 769-774.

ROGALSKI, M. Enraizamento *in vitro* de portaenxerto de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.293-6, 2003.

SANO, S.M.; FONSECA, C.E.L.; SILVA, J.A.; CHARCHAR, M.J.d.A. **Teste de progênies de baru, jatobá e mangaba**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1999. 4p. (Embrapa-CPAC. Pesquisa em andamento, 74).

SANO, M. S., RIBEIRO, F. J., BRITO, M. A., **Baru: Biologia e Uso**. Planaltina-DF. Embrapa Cerrados. 52p. 2004.

SANTANA, J.R.F. de. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica. v. 1, 2010, 446 p.

SIQUEIRA, A.C.M.F.; NOGUEIRA, J.C.B.; MORAIS, E.; KAGEYAMA, P.; MURGEL, J.M.T.; ZANDARIN, M.A. O cumbaru - *Dipteryx alata* Vog. Estudo de diferentes procedências e progênies. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, série A, São Paulo, v.40, n.1, p.281-290, dez. 1986.

SOUZA, O.R., NASSER, V.L., SOARES, A.R.F.S. Contribuição da castanha do baru como fonte de renda para família extrativista do município de Orizona em Goiás, In: Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, 4, 2013, **Anais eletrônicos...** Salvador: IBGEAS, 2013. Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2013/XI-082.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2014.

STOYNOVA, B.E. et al. Cell division and cell expansion in cotyledons of arabidopsis seedlings. **New Physiologist**, v.162, p.471, 2004.

TAKEMOTO, E.; OKADA, I.A.; GARBELOTTI, M.L.; TAVARES, M.; AUDEPIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do município de Pirinópolis, estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, n.60, v. 2, p. 113-117, 2001.

TOGASHI, M. **Composição e caracterização química e nutricional do fruto do baru (*Dipteryx alata*, Vog.)**. Campinas: UNICAMP, 1993. 108p. Tese de Mestrado.

VALLILO, M.I.; TAVARES, M.; AUED, S. Composição química da polpa e da semente do fruto do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) - caracterização do óleo da semente. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.2, n.2, p.115-125, dez. 1990.

VERA, R, SOUZA, E. R. B. Baru. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. 31, n.1, p. 0. 2009.

## CAPÍTULO II

### MEIOS DE CULTIVO NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE BARUEIRO (*Dipteryx alata* Vog.)

#### RESUMO

ARARUNA, ELEQUISANDRA DA COSTA. **Meios de cultivo no desenvolvimento *in vitro* de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.).** 2015. 66 p. TESE (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.<sup>1</sup>

O Cerrado é o segundo bioma em biodiversidade do Brasil, apresentando grande endemismo vegetal. Nativo deste bioma, o barueiro (*Dipteryx alata* Vog.), da família Fabaceae, é uma espécie com mercado garantido, mas com baixo número de cultivos. Por isto, para atender as necessidades crescentes de consumo dessa espécie, torna-se necessário aperfeiçoar e desenvolver subsídios para sua domesticação. Estas divergências demonstram o motivo da busca constante por alternativas de meios e/ou adequações que se prestam ao cultivo *in vitro* de diferentes espécies vegetais. Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar concentrações de sais e meios de cultura para a germinação e desenvolvimento inicial de ápice caulinar (AC) de mudas de *Dipteryx alata*, proveniente de plantas cultivadas *in vitro*. Para tanto, foram avaliados dois meios de cultura (MS e WPM) nas concentrações de sais de 25, 50, 75 e 100%. As características avaliadas aos 120 dias foram, comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CP), massa fresca (MF), massa seca (MSC), diâmetro do caule (DC) e número de folhas (NF). O meio MS, em sua concentração original, é promissor para o estabelecimento *in vitro* do barueiro, resultando em maior comprimento da raiz (27,65 cm) e número de folhas por planta (26 folhas), características que sinalizam o sucesso do estabelecimento *in vitro*. Assim, o meio MS pleno é mais indicado para o estabelecimento *in vitro* de ápice caulinar (AC) de *Dipteryx alata*.

**Palavras chave:** cultura de tecidos, concentrações de sais, meio de cultura.

---

<sup>1</sup>Orientador: Berildo de Melo- UFU



## ABSTRACT

ARARUNA, ELEQUISANDRA DA COSTA. **Cultivation media on *Dipteryx alata* Vog. *in vitro* development.** 2015. 66 p. Thesis (Doctorate in Agronomy / Crop Science) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.<sup>1</sup>

The savannah is the second most important ecosystem for biodiversity in Brazil, presenting great vegetation endemism. Native in this biome, *Dipteryx alata* Vog., from the Fabaceae, is a species with assured market, but with a small number of growing areas. Therefore, in order to meet the increasing consumption needs for this species, it is mandatory to improve and develop protocols for its domestication. These divergences demonstrate the reason for the constant search for alternative media and, or, adaptations for *in vitro* cultivation of different plant species. Thus, this study determined salt concentration and culture media for germination and initial development of shoots of *Dipteryx alata* plantlets, from *in vitro* cultivated plants. Two culture media (MS and WPM) were evaluated in the salt concentrations of 25, 50, 75 or 100%. As The characteristics evaluated 120 days after transfer were shoot length, root length, fresh weight, dry matter, stem diameter and number of leaves. The medium MS, in its original concentration, is promising for *in vitro* establishment of *Dipteryx alata*, resulting in greater root length (27.65 cm) and number of leaves per plant (26 leaves), characteristics that indicate success in *in vitro* establishment. Thus, full strength MS is the most indicated for *in vitro* establishment *Dipteryx alata* stem shoots.

**Keywords:** Tissue culture, salt concentration, culture medium.

---

<sup>1</sup>Orientador: Berildo de Melo- UFU

## 1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo bioma em biodiversidade do Brasil, apresentando grande endemismo vegetal (AQUINO et al., 2009; FAO, 2014). Nativo deste bioma, o barueiro (*Dipteryx alata* Vog.), pertencente à família Fabaceae, é uma espécie economicamente promissora, com múltiplos usos, como o aproveitamento da madeira, dos frutos e das sementes (RATTER et al. 2000; DURIGAN et al., 2011).

Indubitavelmente, esta espécie tem grande potencial na fruticultura, visto a baixa exigência de cultivo, contrapondo a grande qualidade do fruto produzido, o qual mostra mercado consumidor vertiginoso. Para atender as necessidades crescentes de consumo, torna-se necessário aperfeiçoar e, ao mesmo tempo, desenvolver subsídios para a domesticação da espécie (HERINGER, 1978). Pensando nisto, a biotecnologia pode ser um grande aliado da agricultura e do ambiente (PEREIRA; PASQUALETO, 2011).

Estudos de técnicas de cultivo *in vitro* com barueiro são incipientes. Os poucos relatos acerca da micropropagação de *Dipteryx alata* são com germinação de sementes *in vitro*, porém com resultados inconclusivos (MAMEDES; ARAÚJO, 2010; PINHAL, 2012). Além disto, trabalhos de biotecnologia vêm sendo feitos com espécies do mesmo gênero, como *D. odorata* (Aubl.) Willd. e *D. oleifera* Benth., o que pode fornecer informações valiosas (GÓMEZ; ATEHORTÚA, 2013). No entanto, o foco principal destes se dá na produção de células em suspensão, visando extrair substância de interesses farmacocômicos (GÓMEZ; ATEHORTÚA, 2013). Em ambas as situações, seja produção de mudas ou de células em suspensão, têm-se como gargalo a determinação do meio nutritivo para o desenvolvimento *in vitro* do *Dipteryx alata*, considerado etapa primordial para qualquer protocolo de micropropagação.

Os meios de cultivo fornecem aos explantes substâncias essenciais para o crescimento *in vitro*, todavia a resposta pode ser diferenciada. Esta resposta se baseia na interação dos explantes (com diferentes componentes minerais e concentrações de fitormônios) com os elementos presentes no meio. O meio Murashige e Skoog - MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962; GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998), formulado para o cultivo *in vitro* de células de tabaco (*Nicotiana* sp), é eficiente para a maioria das espécies vegetais herbáceas; no entanto, espécies mais lenhosas frequentemente não são responsivas à composição original deste meio. Para o cultivo dessas espécies, modificações, como a redução do teor de macronutrientes, apresentam melhor

desempenho. Isto porque a concentração de sais ou outros compostos osmoticamente ativos no meio nutritivo pode ser o fator responsável pela adequada ativação de rotas metabólicas que culminam no processo germinativo e, conseqüentemente, no desenvolvimento das plântulas (PASQUAL, 2001).

Em contrapartida, a substituição do meio MS pleno pelo meio *Woody Plant Medium* - WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), com composição mais diluída em nutrientes e originalmente formulado para espécies lenhosas (MELO et al., 1998), também pode ser uma opção viável. A exemplo, resultados positivos com o uso do meio WPM, em detrimento ao MS, na micropropagação foram observados com algumas espécies lenhosas savânicas, como *Eugenia involucrata* O. Berge (ANIS et al., 2010; GOLLE et al., 2012). De acordo com Pasqual (2001), o meio WPM, quando comparado ao meio MS, possui 25% a mais da concentração de íons nitrato e amônia, no entanto, apresenta mais potássio e elevado nível de íons sulfato. Estas divergências demonstram o motivo da busca constante por alternativas de meios e/ou adequações de meios que se prestam ao cultivo *in vitro* de diferentes espécies vegetais. Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições para a germinação e desenvolvimento inicial de ápice caulinar (AC) de mudas de *D. alata*, proveniente do cultivo *in vitro*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e beneficiamento dos frutos e sementes**

Os frutos de barueiro (*Dipteryx alata*) foram coletados em árvores, situadas na Fazenda Água Limpa, localizada na Rodovia MG-455, Km 18, Uberlândia –MG. O critério para coleta destes frutos foi estágio de maturação completo. Após a coleta, os frutos foram levados ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia para processamento e extração das sementes.

A extração das sementes foi feita com o uso de máquina com propulsão mecânica para corte (Figura 1). As sementes danificadas pelo corte, consumidas por insetos e aparentemente mal formadas foram descartadas.



**Figura 1:** Máquina de propulsão mecânica para corte de frutos de barueiro (Foto: Laboratório de sementes , UFU).

## 2.2 Produção das mudas *in vitro*

As sementes extraídas foram lavadas em água corrente por cinco minutos em álcool 70% de pureza ( $v v^{-1}$ ) durante dois minutos e posteriormente, foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio 2% de cloro ativo ( $v v^{-1}$ ) sob agitação, por 30 minutos. Ao término deste processo, na câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Após o processo de assepsia, descartou-se as sementes visivelmente embebidas.

Após o processamento, as sementes foram inoculadas em frasco de vidro (150 mL), preenchidos com 50 mL de meio MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962). Este meio foi suplementado com  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  de tiamina;  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de piridoxina;  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de

ácido nicotínico; 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 0,5 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada (TABAI, 1992), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 3g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 8 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7.

Estes meios foram autoclavados à 121°C, durante 20 minutos. Antes e durante a inoculação, todos os instrumentos foram flambados para esterilização. Na câmara de fluxo laminar, submetida à desinfestação com álcool 70% de pureza (v v<sup>-1</sup>) e radiação ultravioleta (15 minutos), para prevenir contaminações.

A germinação e o desenvolvimento das plantas ocorreram em sala de crescimento, a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 25 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após 60 dias da inoculação, as plantas foram hierarquizadas quanto ao desenvolvimento e as que apresentavam partes aéreas e radiculares bem formadas foram consideradas aptas, formando as plantas fornecedoras de explantes (ápice caulinar - AC) para a condução do experimento.

### **2.3 Desenvolvimento *in vitro* de barueiro**

A repicagem ocorreu em condições similares as da inoculação e o estabelecimento em condições similares ao do desenvolvimento das plântulas oriundas das sementes. Entretanto, usou-se os meios de cultura – MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD ; MCCOWN, 1981) nas concentrações de sais de 25, 50; 75 e 100% (Tabela 1), que correspondiam aos tratamentos. Os meios foram suplementados com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH ajustado antes da autoclavagem para 5,7 (TABAI, 1992).

### **2.4 Características analisadas**

O desenvolvimento das plantas foi acompanhado por 120 dias. Ao final foram avaliados o comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CR), o diâmetro do caule (DIA), o número de folhas (NF), a massa fresca (MF) e seca (MSC) das plantas desenvolvidas.

## 2.5 Delineamento experimental

As parcelas, em um total de cinco por tratamento, foram compostas por 10 frascos, cada um com dois explantes de AC. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado.

**Tabela 1.** Meios de cultura MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) e WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD ; MCCOWN, 1981) e concentrações de sais utilizados para o desenvolvimento *in vitro* de barueiros (*Dypterixy alata* Vog.)

Tratamentos	Meio de Cultura	Concentração dos sais(%)
T1	MS	25
T2	MS	50
T3	MS	75
T4	MS	100
T5	WPM	25
T6	WPM	50
T7	WPM	75
T8	WPM	100

Para todas as características, procedeu-se a checagem, a 0,01 de significância, das pressuposições de normalidade dos resíduos e de homogeneidade de variâncias, pelos testes de Komogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. A transformação dos dados foi realizada quando ao menos uma das pressuposições não foi atendida. Em seguida, fez-se novamente a checagem das pressuposições.

Quando todas as pressuposições foram atendidas, fez-se uso da ANOVA (F de *Snedecor*). A comparação das médias para sais foi realizada pelo teste de Tukey e para as concentrações dos sais determinou modelos de regressão. Em ambos os casos, a significância foi de 0,05. Os modelos de regressão, linear ou quadrático, foram escolhidos em virtude da significância, dispersão dos pontos e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento *in vitro* do barueiro é determinado pela concentração salina quanto pelo tipo de meio. Do mesmo modo, o efeito deste meio em cada parte da planta é distinto. A saber, diâmetro do caule (DC) apresenta melhor desenvolvimento dependendo da concentração salina e tipo do meio (Tabela 2).

**Tabela 2-** Diâmetro do caule (DC) de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) cultivadas em meios MS e WPM, avaliadas aos 120 dias após inoculação.

Meio	Diâmetro do caule (mm)			
	Concentração			
	25	50	75	100
MS	0,87 b	1,89 a	1,88 a	2,16 b
WPM	1,54 a	1,88 a	2,06 a	3,48 b

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas dentro da mesma característica diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. <sup>2</sup> Valores em negritos indicam variância homogênea e resíduos com distribuição normal pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente; ambos a 0,05 de significância.

Em geral, o meio WPM resultou em um maior desenvolvimento do caule, possivelmente devido o meio MS em doses menores (DC 25% = 0,87 cm) terem restrição de algum nutriente e dose maiores (DC 100% = 2,16 cm) causar fitotoxidez. É interessante salientar que nas doses intermediárias o diâmetro do caule não diferiu para ambos os meios de cultura estando próximo a 2,0 mm. O comprimento da maior raiz (CR), comprimento da parte aérea (CPA), além do número de folhas (NF), massa fresca (MF) e massa seca (MSC) desta espécie, por sua vez, não são influenciados por esta interação (Tabela 3).

**Tabela 3-** Comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CR), número de folhas (NF), massa fresca (MF) e massa seca (MSC) de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) cultivadas em meios MS e WPM, avaliadas aos 120 dias após inoculação.

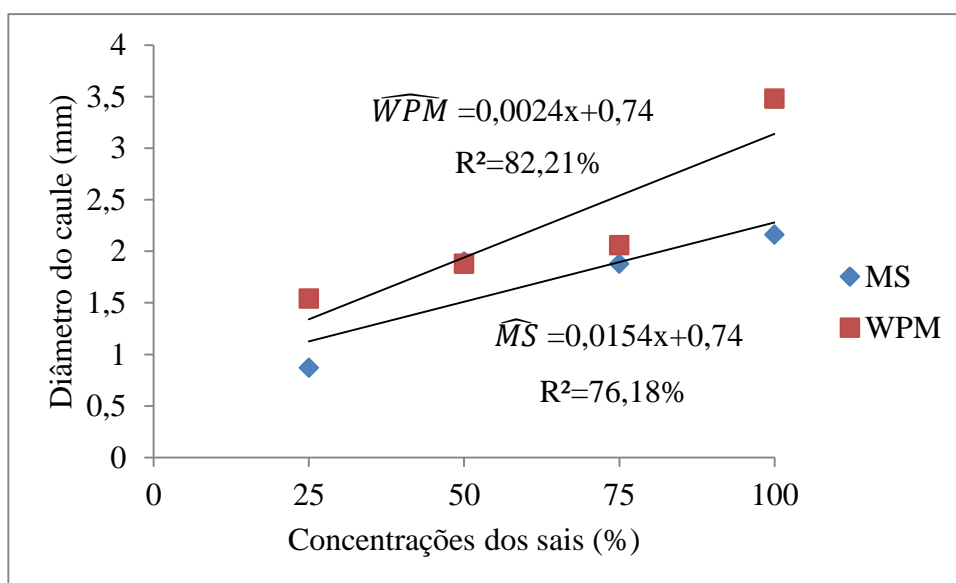
Meio	Comprimento parte aérea (cm)	Comprimento raiz (cm)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Número de folhas
MS	5,55 a	27,65 a	0,92 a	2,87 a	26,00 a
WPM	6,50 a	23,30 b	0,85 a	2,35 b	21,15 b

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas dentro da mesma característica diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. <sup>2</sup> Valores em negritos indicam variância homogênea e resíduos com distribuição normal pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente; ambos a 0,05 de significância.

O meio MS favoreceu o desenvolvimento da raiz (CR), a qual culminou possivelmente em melhor absorção nutriente, resultando em maior desenvolvimento da planta (NF = 26 e MF= 2,35). A única característica incrementada pelo meio WPM foi o diâmetro do caule (tabela 3). Contraditoriamente ao observado para a massa fresca (MF), a massa seca (MSC) e comprimento da parte aérea (CPA) não são influenciadas pelo tipo de meio. É importante ressaltar que durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996; MALDANER et al., 2006). Neste sentido, a pressão osmótica elevada limita a absorção de água, sendo que a diluição aumenta a disponibilidade hídrica e reduz a oxigenação (TAIZ; ZEIGER, 2004). Fato que pode ter influenciado no desenvolvimento

do caule das plantas de barueiro, uma vez que estas apresentaram resultados positivo em meio WPM, que apresenta baixa concentração de sais em comparação ao MS.

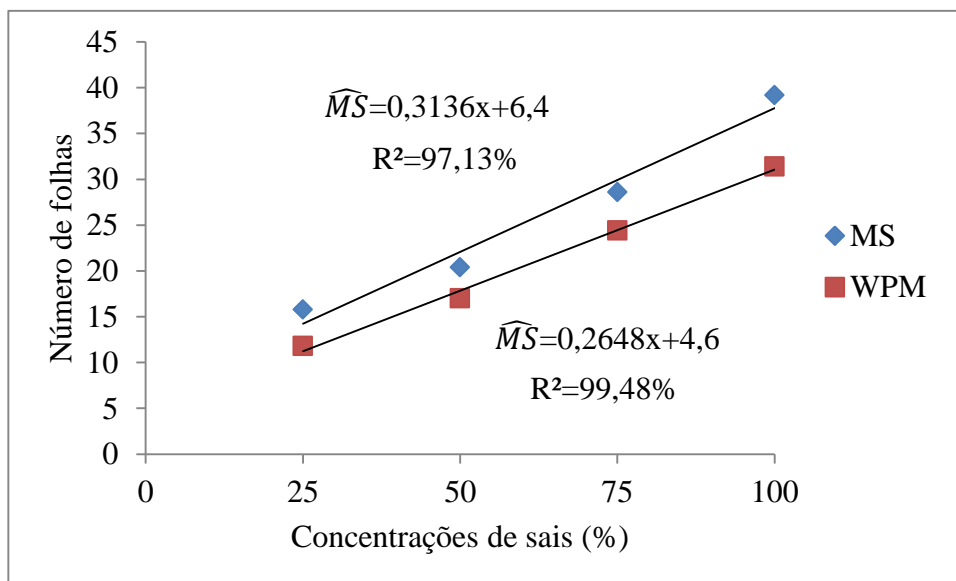
O diâmetro do caule (DC) apresentou efeitos lineares com incremento de 0,0154 e 0,024 mm a cada 1% de suplementação da concentração de sais em meio MS e WPM respectivamente (Figura 2). É importante ressaltar que estes resultados são altamente representativos deste comportamento, visto o bom ajuste dos dados ao modelo ( $R^2 = 76,18\%$  em MS e  $R^2 = 82,21\%$  em meio WPM).



**Figura 2:** Diâmetro do caule de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.

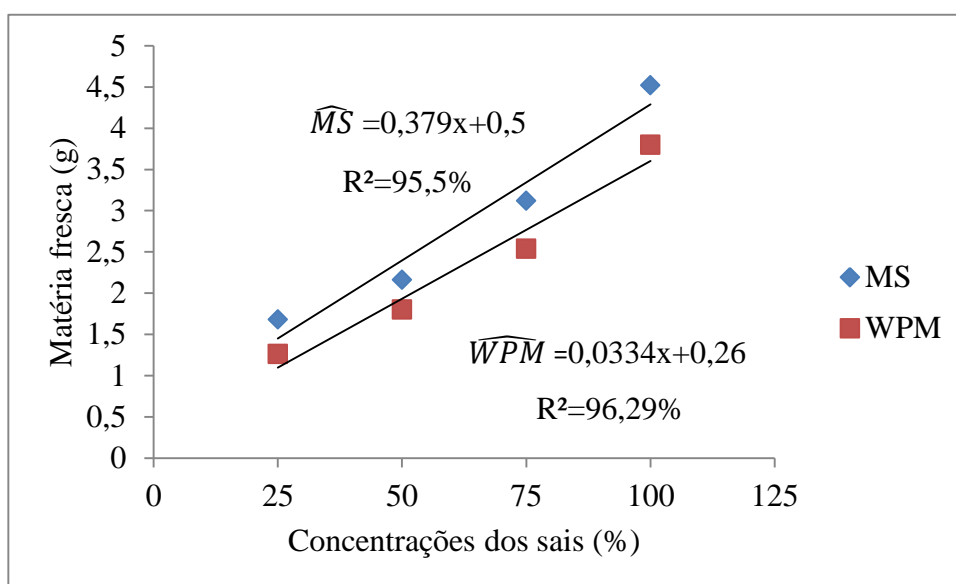
Para NF o comportamento foi semelhante, tanto no meio MS quanto para o WPM, com incremento lineares de 0,3136 e 0,2648 cm a cada unidade de aumento da concentração, respectivamente (Figura 3). O meio MS ainda na concentração de 25% apresenta superior ao WPM e essa relação se manteve com o aumento da dose, possivelmente por limitação a algum nutriente em sua constituição. Para *Dipteryx alata* sabe-se que a adição dos macronutrientes é significativa no crescimento, aumentando o crescimento em diâmetro, número de folhas, área foliar, produção de massa seca das folhas, caule e raízes (MELO et al, 1998).





**Figura 3:** Número de folhas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.

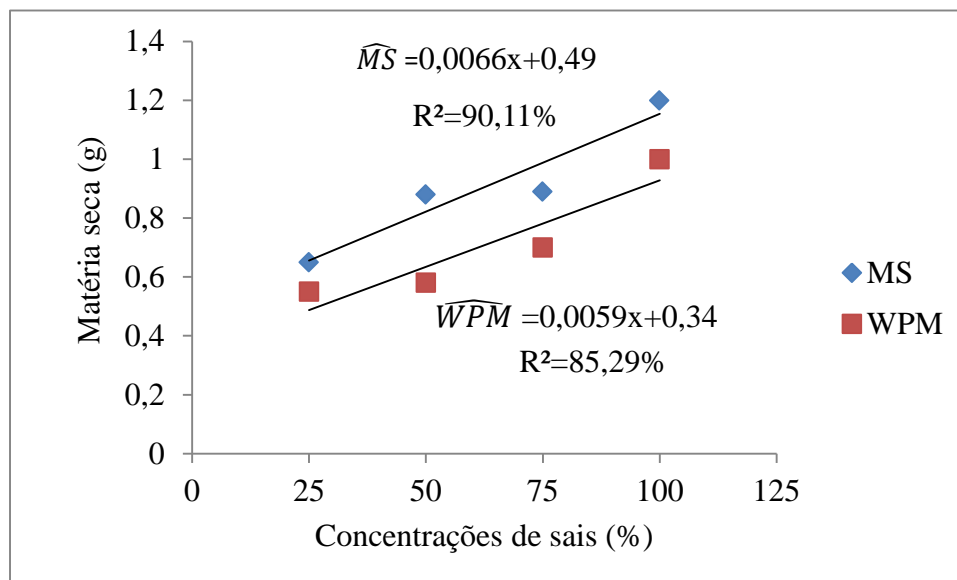
A MF teve incrementos lineares, com bom ajuste ( $R^2 \geq 90\%$ ). A cada aumento de uma unidade da concentração dos sais, houve o incremento de 0,0379 cm em meio MS e 0,0334 cm em meio WPM. (Figura 4).



**Figura 4:** Massa fresca de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.

A MSC também teve incremento linear, com bom ajuste ( $R^2 \geq 80\%$ ; Figura 5). A cada aumento de uma unidade da concentração dos sais, houve o incremento de 0,0066 e 0,0059 cm em meio MS e WPM respectivamente (Figura 5). Os resultados apresentados demonstram que o barueiro é uma espécie lenhosa responsiva a grande concentração

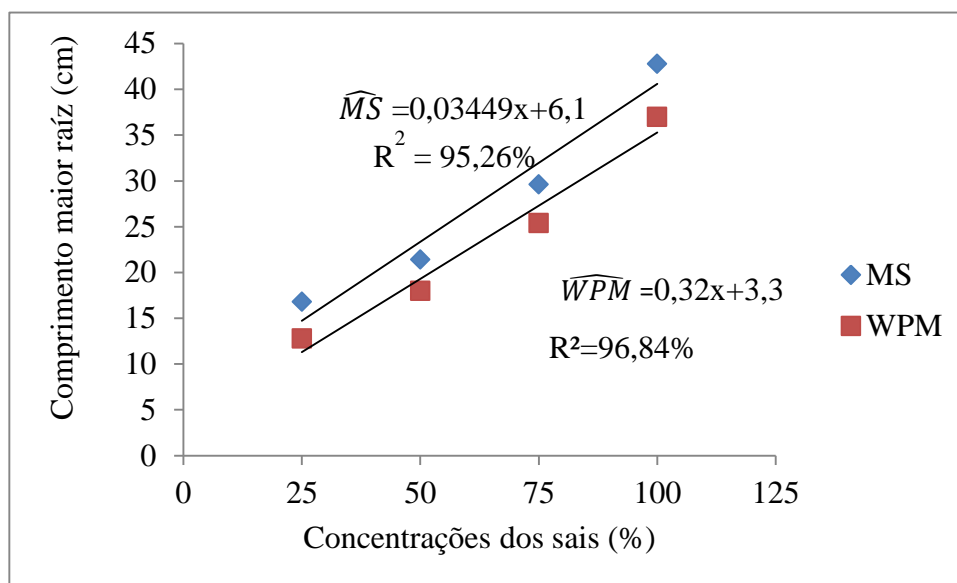
iônica do meio de cultivo. É sabido que o fornecimento exógeno de hidratos de carbono é importante para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*, uma vez que fornece átomos de carbono que serão utilizados na respiração e que são precursores para a síntese de compostos estruturais e funcionais (CALDAS et al 1998;. THORPE et al . 2008). Nutrientes como um todo, principalmente do Zn e N que atuam diretamente no metabolismo de crescimento da planta, favorecem tanto o alongamento como também no desenvolvimento de folhas (YIN et al., 2003).



**Figura 5:** Massa seca de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.

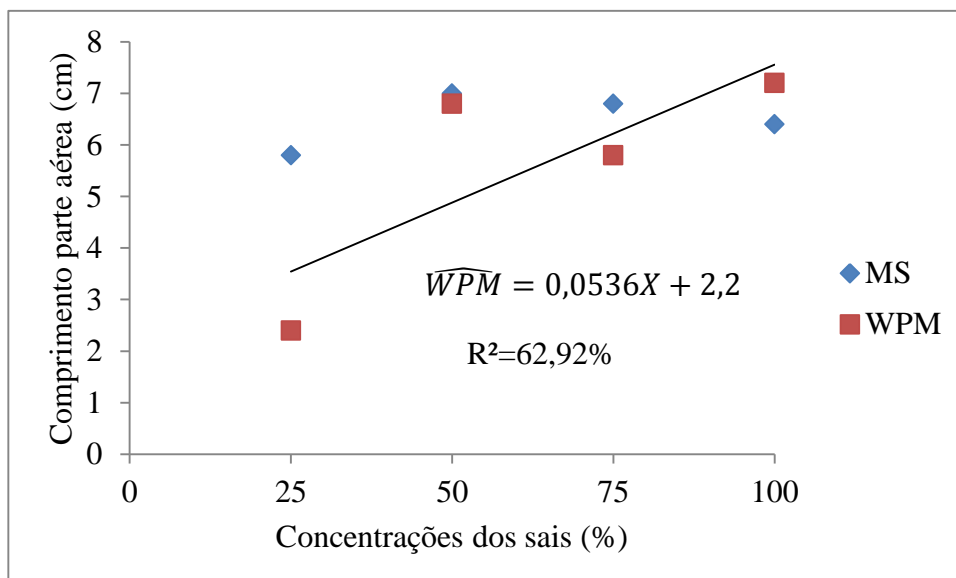
Com bom ajuste ( $R^2 \geq 90\%$ ; Figura 6) o comprimento da maior raiz (CR) também teve incrementos lineares. A cada aumento de uma unidade da concentração dos sais, houve o incremento de 0,344 cm em meio MS e 0,0322 cm em meio WPM. (Figura 6). Isso converge para a produção de mudas com doses maiores de sais, pois vale ressaltar que o barueiro é uma espécie oriunda do Cerrado, região com chuvas escassas. Além disto, esta espécie tem preferência por locais com solos bem drenados de textura argilosa e muito argilosa (VERA; SOUZA, 2009). Ainda sobre a ocorrência da espécie, ela predomina em áreas do cerrado cujos solos apresentam média fertilidade (SANO et al, 2004). A baixa disponibilidade de água, nutrientes e a acidez dos solos desta região são fatores limitantes para o estabelecimento de espécies. Isso sustenta a teoria da necessidade de um sistema radicular bem formado para a manutenção da planta a longo do tempo. É interessante reportar que esta espécie é nativa do Cerrado, ambiente de solos distróficos,

saturados em alumínio e com pH muito baixo, que passa por períodos de estiagem severos. Por isto, as espécies oriundas deste bioma estão adaptadas à restrição hídrica, que é obtida em meios com elevada concentração de sais. Isto explica porque, muitas espécies lenhosas, são tão responsivas ao incremento da concentração de sais no meio. Fato que confirma resultados aqui encontrados.



**Figura 6:** Comprimento da maior raiz de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.

Sabe-se que em geral quanto maior desenvolvimento dos sistemas radicular, maior desenvolvimento vegetativo, em virtude da maior interceptação de nutriente. Fato obtido neste trabalho, com os incrementos também lineares do comprimento da parte aérea (CPA). Ressalta-se que a cada aumento de uma unidade da concentração dos sais, houve o incremento de 0,0536 cm em meio MS (Figura 7), todavia os dados foram dispersos ( $R^2=62,92$ ) em meio WPM. Quanto o meio MS, nenhuma regressão de modelo linear ou quadrática se adequou aos dados, apresentando apenas a dispersão dos pontos (Figura 7).



**Figura 7:** Comprimento da parte aérea de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de meio MS e WPM.

Plântulas de barueiro oriundas de ápices caulinares aos 120 dias apresentam 27,65 cm no comprimento da raiz e 26,0 folhas por planta, características que sinalizam o sucesso do estabelecimento *in vitro*.

#### 4. CONCLUSÃO

O meio MS pleno é mais indicado para o estabelecimento *in vitro* de ápice caulinar (AC) de *Dipteryx alata*.

## REFERÊNCIAS

- ANIS M.; VARSHNEY A.; SIDDIQUE I. *In vitro* clonal propagation of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. **Agroforestry systems**, Dordrecht, v.78, n.2, p. 151- 158, Feb. 2010.
- AQUINO, F.G.; OLIVEIRA, M.C.; RIBEIRO, J.F.; PASSOS, F.B. **Módulos de Recuperação de Cerrado com Espécies Nativas de Uso Múltiplo**. Planaltina-DF, Embrapa Cerrados, 2009.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. E BUSO, J.A.. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**, Volume 1. Brasília - DF: Embrapa, v. 1, 1998, p. 133-145.
- DURIGAN, G; MELO, A. C. G. de; MAX, J. C. M.; BOAS, O. V.; CONTIERI, W. A.; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado** / Giselda Durigan [et al.]. 3ª ed. rev. e atual. São Paulo : SMA, 2011. 19 p.
- FAO. The Statistics Division. **FAOSTAT**: core production data. Disponível em:<<http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>>. Acesso em: 01 nov. 2014.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 574p. 1996.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, jan.-mar. 2012.
- GÓMEZ, P. A. M., ATEHORTÚA, L. G., **Choiba culturas de células de *Dipteryx oleífera* Benth.** International Journal of Biotechnology. V.15, n.2, 2013.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In:TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI, 1998. p. 183-260.
- HERINGER, E. P. Comportamento de algumas espécies euxilóforas, quando cultivadas no cerrado de Brasília de sementes procedentes de outras regiões fitogeográficas brasileiras. In: **Congresso latino-americano de botânica**, 2.; congresso brasileiro de botânica, 29; 1978, Brasília/ Goiânia. Resumos, p. 56-57.
- LAMEIRA, O. A.; GOMES, A. P. R.; LOPES, S. C.; LEÃO, N. V. M. **Comunicado Técnico**. n. 21. Efeito da escarificação sobre a germinação de sementes de paricá (*Schizolobiumamazonicum*) *in vitro*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. n. 21., 2000, 3 p.
- LLOYD, G. and B. MCCOWN. 1981. **Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel**, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Sot. 3R420-427
- MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1201-1206, jul./ago. 2006.
- MAMEDES T., ARAÚJO, S., Cultivo *in vitro* de explantes de *Dipteryx alata*. **Anais do VIII Seminário de Iniciação Científica e V Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação Universidade Estadual de Goiás**. p 10. 2010.

- MELO, J. T. de; SILVA, J. A. da; TORRES, R. A. de A.; SILVEIRA, C. E. dos S. da; CALDAS, L. S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p. 195-243.
- MURASHIGE, T.; SKOOG F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **Copenhagem**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.
- PEREIRA, M. E., PASQUALETO, A., **Desenvolvimento sustentável com ênfase em frutíferas do cerrado**. Pontifícia Universidade Católica de Goiás , v.38, n.2, 2011.
- PINHAL, F. H. **Estabelecimento *In Vitro* do Baruzeiro (*Dipteryx alata* vog.)** 2012. 63f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, MG.
- RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. A. B.; SILVA, M. R. Estudo preliminar da distribuição das espécies lenhosas da fitofisionomia Cerrado sentido restrito nos Estados compreendidos pelo Bioma Cerrado. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v.5, p.5-43, 2000.
- SANO, M. S., RIBEIRO, F. J., BRITO, M. A., **Baru: Biologia e Uso**. Planaltina-DF. Embrapa Cerrados. 52p. 2004.
- TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges através de métodos *in vitro***. 1992. 121p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**- 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2004.
- THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2008. p. 311-336.
- VERA, R.; SOUZA, E. R. B. Baru. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. 31, n.1, p. 0. 2009.
- YIN, X.; LATINGA, E. A.; SCHAPENDONK, A. D. H. C. M.; ZHONG, X. Some quantitative relationships between leaf area index and canopy nitrogen content and distribution. **Annals of Botany**, London, v. 91, p. 893-903, 2003.

### CAPITULO III

## ORGANOGENESE *IN VITRO* DE BARUEIRO (*Dipteryx alata* Vog.)

### RESUMO

ARARUNA, ELEQUISANDRA DA COSTA. **Organogênese *in vitro* de barueiro (*dipteryx alata* vog.).** 2015. 66 p. TESE (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.<sup>1</sup>

Dentre as espécies nativas do Cerrado, o barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) é sem dúvidas a com mercado mais solidificado. Contudo, a maior parte dos produtos desta espécie advêm da exploração predatória, muitas vezes, realizadas pela população local como fonte de renda complementar. Esta problemática alerta para a necessidade de proporcionar vias de maximização de cultivos desta espécie. Face ao exposto e em razão do desempenho de plantas de barueiro *in vitro* ainda ser pouco explorado, faz-se necessários estudos que subsidiem protocolos de desenvolvimento desta espécie. Assim, o propósito da investigação foi determinar o efeito da concentração de reguladores de crescimento na multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* de barueiro. Na multiplicação, foram estudadas quatro concentrações de 6– Benzilaminopurina (BAP) (0; 1; 2; 3 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) e adicionado 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA), (concentração fixa de auxina determinada por pré-testes). No alongamento e enraizamento, que ocorrerem simultaneamente, utilizou-se quatro concentrações de ANA (0; 1; 2; 3 e 4 mg.L<sup>-1</sup>) juntamente com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Após 120 dias, realizou-se a avaliação do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa fresca (MF), massa seca (MSC), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF) e número de brotos (NB). A concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi a mais satisfatória. Entretanto, concentrações acima podem potencializar a multiplicação de barueiro. É perceptível a influência do ANA e AIB no alongamento e enraizamento *in vitro* das plantas de barueiro, com melhor CPA de 3,14 cm e CR 15,84 cm. Concentrações de ANA menores que 3 mg L<sup>-1</sup> se mostraram favoráveis para o desenvolvimento *in vitro* da espécie, características essenciais para o sucesso da climatização.

**Palavras chave:** cultura de tecidos, reguladores, meio de cultura.

---

<sup>1</sup>Orientador: Berildo de Melo- UFU

## ABSTRACT

ARARUNA, ELEQUISANDRA DA COSTA. *Dipteryx alata* Vog. *in vitro* organogenesis. 2015. 66 p. Thesis (Doctorate in Agronomy / Crop Science) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.<sup>1</sup>

Among the native species from the Brazilian savannah, *Dipteryx alata* Vog., undoubtedly is the one with the most certain market. However, most products from this species come from predatory extractivism, oftentimes done by local communities in search of supplementary income. This problem brings to light the need to optimize cultivation of this species. This and the lack of knowledge about *D. alata in vitro* performance, demand for studies on protocols for this important species. Therefore, this study determined the effect of growth regulator concentration on *in vitro* multiplication, elongation and rooting of *D. alata*. Four concentrations of BAP (0, 1, 2, 3 or 4 mg L<sup>-1</sup>), amended with ANA at 0.25 mg L<sup>-1</sup>, (fixed auxin concentration determined in preliminary tests) were evaluated. Simultaneous elongation and rooting was evaluated with ANA at 0, 1, 2, 3 or 4 mg L<sup>-1</sup>, amended with AIB at 0.5 mg L<sup>-1</sup>. Shoot length, root length, fresh matter, dry matter, stem diameter, number of leaves and number of sprouts were determined after 120 days. The concentration of 4 mg L<sup>-1</sup> BAP was the best one; however, greater concentrations can boost *D. alata* multiplication. The effect of ANA and AIB were visible on *D. alata in vitro* elongation and rooting, with the best shoot length of 3.14 cm and root length 15.84 cm. Concentrations of ANA below 3 mg L<sup>-1</sup> were favorable for *in vitro* development of species, which are essential for climatization success.

**Keywords:** tissue culture, growth regulators, culture media.

---

<sup>1</sup> Supervisor: Berildo de Melo- UFU



## 1. INTRODUÇÃO

A micropropagação é a técnica de cultura de tecidos com resultados mais concretos e, por isto, é utilizada para obtenção de plantas saudáveis e em larga escala (GRATTAGLIA ; MACHADO, 1998). Engloba diferentes etapas, que incluem o estabelecimento, a multiplicação, o alongamento e o enraizamento de plantas.

Diversas classes de reguladores vegetais são empregadas nessas etapas, sendo adicionados ao meio para direcionar os processos de desenvolvimento e indução da planta *in vitro* (MERCIER, 2012). Os reguladores mais utilizados são auxinas e citocininas, em forma sintética. Destes, ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB) fazem parte do grupo de auxinas comumente utilizadas nas técnicas de alongamento e enraizamento (MERCIER 2012); enquanto 6-Benzilaminopurina (BAP) é a citocinina que apresenta melhores resultados na multiplicação de brotos (GONÇALVES, 2002).

O ANA e o AIB, como são auxinas, atuam na expansão e no alongamento celular, promovendo modificações plásticas na parede celular vegetal durante o processo de divisão e aumentando a extensibilidade da célula (KRIKORIAN, 1991). Assim, são essenciais para o cultivo de plantas. Essas auxinas também podem estimular várias respostas fisiológicas quando utilizadas na indução de raízes, folhas, gemas axilares ou apicais, embriões e calos (CID; ZIMMERMANN, 2010; MERCIER, 2012; GRATTAGLIA ; MACHADO, 1998). No entanto, Salisbury e Ross (2006) ressaltaram que o AIB é usado para induzir a formação de raízes com mais frequência que o ANA ou outra auxina, pois é rapidamente metabolizado especialmente nas fases finais da formação da raiz. Nessa fase é necessário que haja maior alongamento e emissão de raízes para que ocorra a absorção de água e sais minerais (CUNHA, 2003), culminando com a aclimatização das microplantas. O BAP, por sua vez, estimula o crescimento pela expansão mais que alongamento, sendo capaz de promover a quebra da dominância apical e da dormência das gemas laterais, culminando na formação de novos brotos (GEORGE, 1993; STOYNOVA, 2004).

O sucesso desses reguladores depende do balanço entre as concentrações, das interações endógenas e exógenas do explante e da espécie (PIERIK, 1997). A relação auxina/citocinina pode ser sinérgica ou antagônica na regulação de vários processos de desenvolvimento, como a formação e o alongamento apical e radicular, além do

desenvolvimento de raízes laterais e abscisão foliar (MUDAY et al., 2012). As auxinas, em pequenas concentrações, também têm sido relacionadas a vários outros processos de desenvolvimento vegetal, como o desenvolvimento inicial de brotos (MULLER; LEYSER, 2011), desenvolvimento do tecido meristemático (SU et al., 2011) e o controle do metabolismo vegetal (PERNISOVÁ et al., 2011). Segundo Rahman (2013), auxinas desempenham papel central e interage com vários hormônios na regulação, crescimento e desenvolvimento das plantas.

Face ao exposto e em razão do desempenho de plantas de barueiro *in vitro* ainda ser pouco explorado, faz-se necessários estudos que subsidiem protocolos de desenvolvimento desta espécie. Assim, o propósito da investigação foi determinar o efeito da concentração de reguladores de crescimento na multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* de barueiro.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e beneficiamento dos frutos e sementes**

Os frutos dos barueiros (*Dipteryx alata*) foram coletados de árvores, situada na Fazenda Água Limpa, localizada na Rodovia MG-455, Km 18, Uberlândia –MG. Estes frutos apresentavam estágio de maturação completa e foram recolhidos do chão para processamento no laboratório de biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. A extração das sementes foi feita com o uso de uma máquina de propulsão mecânica para corte (Figura 1, CAPÍTULO II). As sementes danificadas pelo corte, consumidas por insetos e aparentemente mal formadas foram descartadas.

As sementes extraídas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, seguida de imersão em álcool 70% de pureza ( $v\ v^{-1}$ ), durante dois minutos. Posteriormente, foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio 2% de cloro ativo ( $v\ v^{-1}$ ) sob agitação, por 30 minutos. Ao término deste processo, na câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Após o processo de assepsia, descartou-se as sementes visivelmente embebidas.

O material asséptico foi inoculado em frascos de vidro (150 mL), preenchidos com 50 mL de meio MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962). Este meio foi suplementado com 0,4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina; 1 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina; 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico; 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 0,5 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada (TABAI, 1992), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 3g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 8 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7.

Estes meios foram autoclavados à 121°C, durante 20 minutos. Antes e durante a inoculação, todos os instrumentos foram flambados para esterilização. Na câmara de fluxo laminar, submetida à desinfestação com álcool 70% de pureza (v v<sup>-1</sup>) e radiação ultravioleta (15 minutos), para minimizar contaminações.

A germinação e o desenvolvimento das plantas ocorreram em sala de crescimento, a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 25 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após 60 dias da inoculação, as plantas foram hierarquizadas quanto ao desenvolvimento e as que apresentavam partes aéreas e radiculares bem formadas foram consideradas aptas, formando o banco de germoplasma fornecedor de explantes (ápice caulinar - AC) para a condução do experimento.

## **2.2 Organogênese *in vitro* de barueiro**

A repicagem ocorreu em condições similares ao da inoculação; enquanto a multiplicação e alongamento, em condições similares ao do desenvolvimento das plântulas oriundas das sementes. Em todos os tratamentos, usou-se o meio de cultura – MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962), suplementados com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar, com pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem (TABAI, 1992).

Pré-testes foram realizados para determinar a eficácia do contrabalancear de tipos de auxina nas etapas de multiplicação e alongamento e enraizamento *in vitro* das plantas de baru. Nestes ensaios, constatou-se que a fixação de doses de auxina (ANA na etapa de multiplicação e AIB na de alongamento e enraizamento) era necessário para a maximização de desenvolvimento da espécie. Por isto, na multiplicação, os tratamentos consistiram em quatro concentrações de BAP (0; 1; 2; 3 e 4 mg L<sup>-1</sup>) e 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Tabela 1). No alongamento e enraizamento, que ocorreram simultaneamente, utilizou-se quatro concentrações de ANA (0; 1; 2; 3 e 4 mg L<sup>-1</sup>) e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Tabela 2).

**Tabela 1-** Concentrações de BAP em meio de cultura MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) para a multiplicação *in vitro* de barueiros (*Dypterixy alata* Vog.)

Tratamentos	Concentração de BAP mg L <sup>-1</sup>
T1	0
T2	1
T3	2
T4	3
T5	4

**Tabela 2-** Concentrações de ácido naftalenoacético em meio de cultura MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) para a alongamento e enraizamento *in vitro* de barueiros (*Dypterixy alata* Vog.)

Tratamentos	Concentração de ANA mg L <sup>-1</sup>
T1	0
T2	1
T3	2
T4	3
T5	4

### 2.3 Delineamento experimental

Em todos os tratamentos, as parcelas foram compostas de cinco repetições de 10 frascos cada. Em cada frasco, haviam dois explantes de ápice caulinar. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

O desenvolvimento das plantas foi acompanhado por período de quatro meses. Ao final foram avaliados o comprimento da parte aérea (CPA) e da maior raiz (CR); o diâmetro do caule (DC); o número de folhas (NF); a massa fresca (MF) e o número de brotos (NB), este último uma avaliação específica da multiplicação. No caso específico de enraizamento e alongamento, avaliou-se também a massa seca (MSC).

## 2.4 Análise estatística

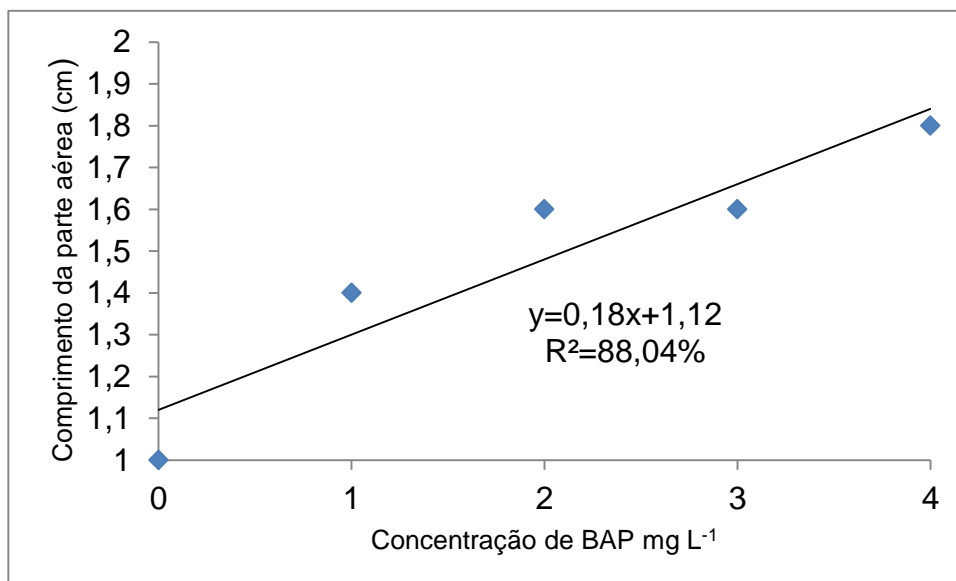
Para todas as características, procedeu-se a checagem, a 0,01 de significância, das pressuposições de normalidade dos resíduos e de homogeneidade de variâncias pelos testes de Komogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. A transformação dos dados foi realizada quando ao menos uma das pressuposições não foi atendida. Em seguida, fez-se checagem das pressuposições novamente.

Quando todas as pressuposições foram atendidas, fez-se uso da ANOVA (F de *Snedecor*), seguido da comparação das médias pela regressão polinomial, para as concentrações a 0,05 de significância. Os modelos de regressão, linear ou quadrático, foram escolhidos em virtude da significância, dispersão dos pontos e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Neste sentido, quando não foi possível determinar o ponto de máxima ou mínima curvatura dentro do intervalo testado (25 a 100% de sais), optou-se pelo modelo linear, mesmo quando o quadrático foi significativo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

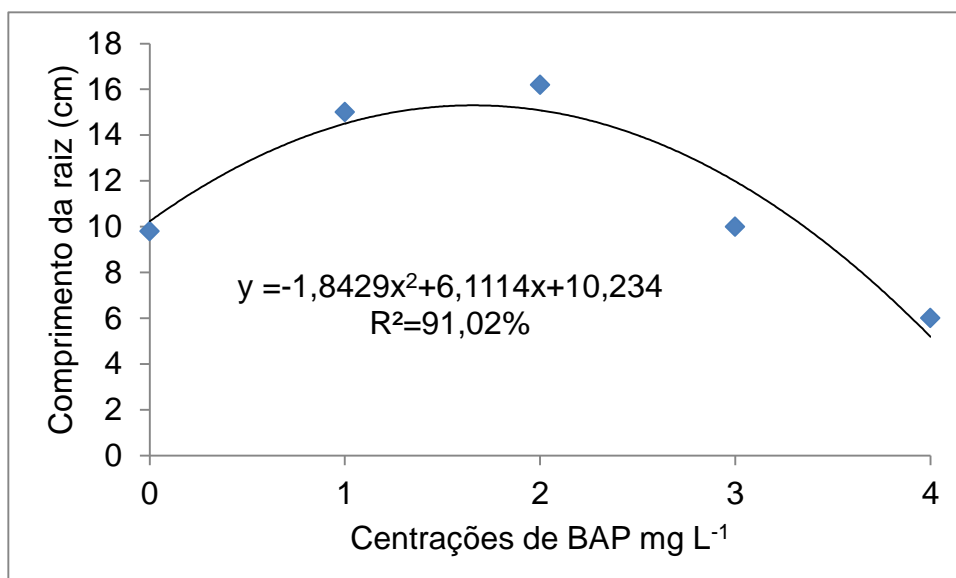
### Experimento Multiplicação

O Comprimento da parte aérea (CPA) teve incremento linear, com modelo bem ajustado ( $R^2 \geq 80\%$ ; Figura 1). O aumento a cada 1 mg L<sup>-1</sup> da concentração de BAP acarretou em incremento de 0,18 cm. (Figura 1).



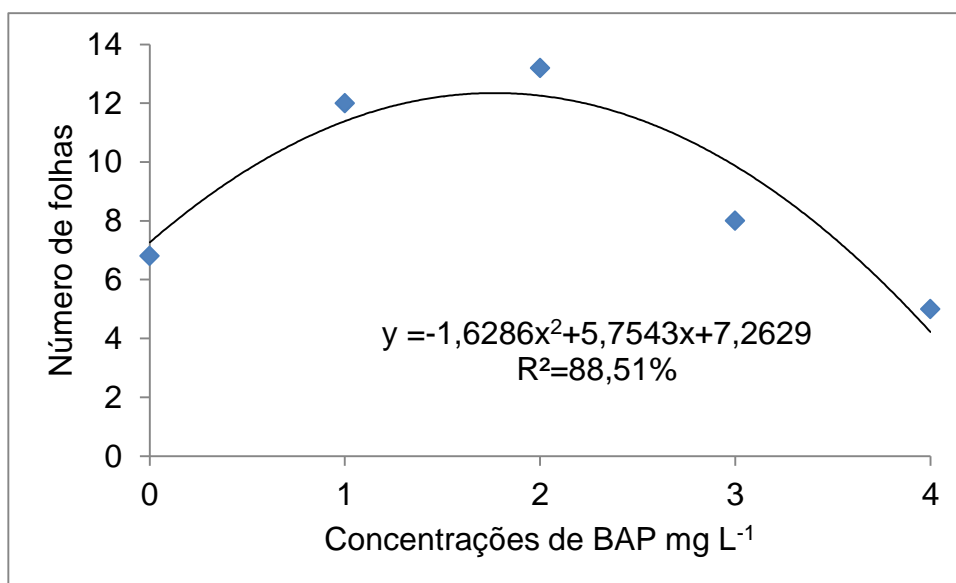
**Figura 1** - Comprimento da parte aérea de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de BAP.

O comprimento de raiz de barueiro possui comportamento quadrático, com bom ajuste ( $R^2 = 91,02\%$ ), quando analisado sobre concentrações de BAP variando entre 0 e 4 mg L<sup>-1</sup> (Figura 2). A concentração de 1,6581 mg L<sup>-1</sup> de BAP propicia melhor desenvolvimento de raiz primária de barueiro. Esta dose promove raiz com 15,3006 cm de comprimento (Figura 2).



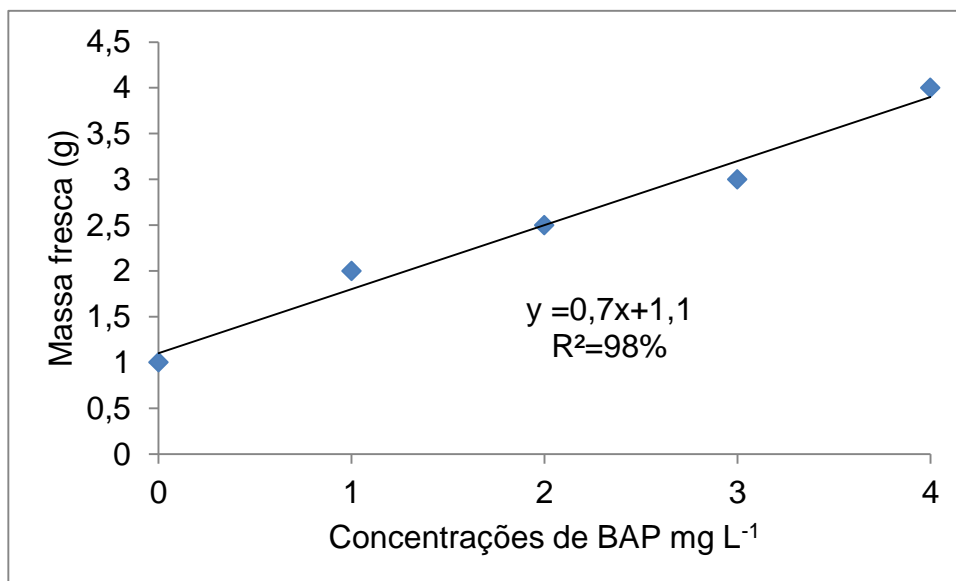
**Figura 2** - Comprimento da maior raiz de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de BAP.

O número de folhas de barueiro possui comportamento quadrático, com bom ajuste ( $R^2 = 88,51\%$ ), quando analisado sobre concentrações de BAP variando entre 0 e 4 mg L<sup>-1</sup> (Figura 3). A concentração 2,1695 mg L<sup>-1</sup> de BAP propicia melhor número de folhas de plantas de barueiro, média de 12,08 folhas por planta (Figura 3).



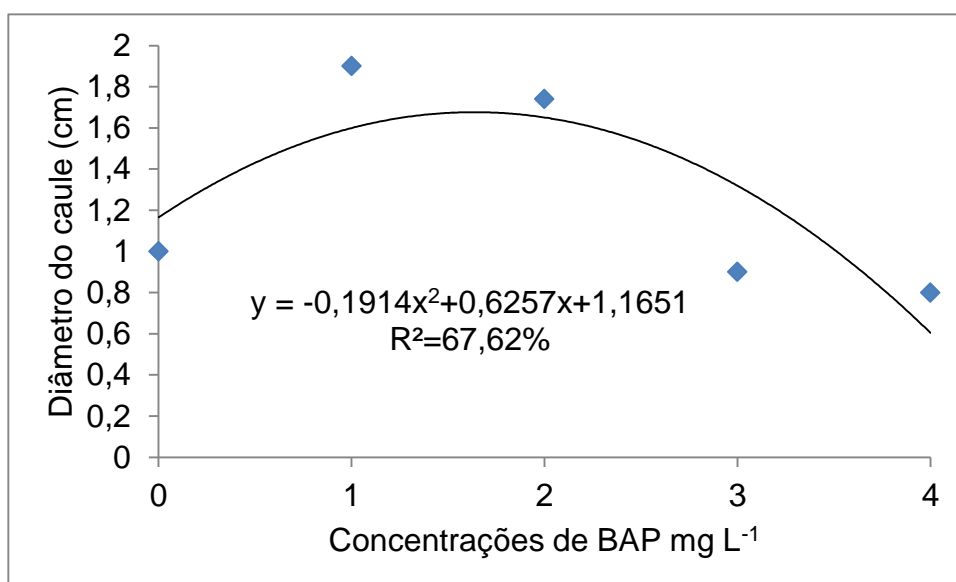
**Figura 3** - Número de folhas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de BAP.

A MF teve incremento linear, com modelo bem ajustado ( $R^2 \geq 90\%$ ; Figura 4). O aumento de uma unidade da concentração de BAP acarretou em incremento de 0,7 g. (Figura 4).



**Figura 4-** Massa fresca de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de BAP.

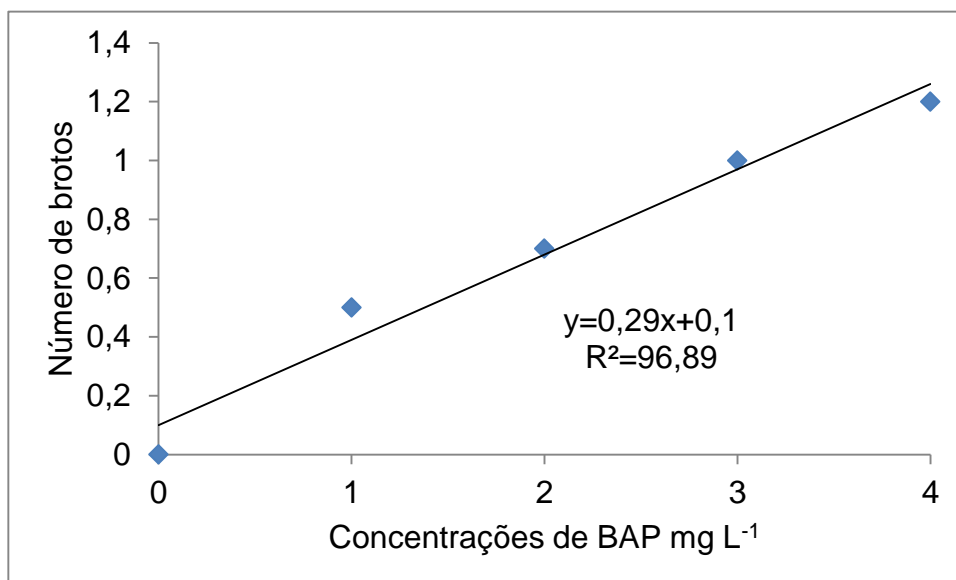
O diâmetro do caule de plantas de barueiro possui comportamento quadrático ( $R^2 = 67,62\%$ ). A concentração 1,63 mg L<sup>-1</sup> de BAP propicia melhor desenvolvimento do diâmetro do caule de barueiro. Esta dose promoveu diâmetro com 1,67 mm de comprimento (Figura 5).



**Figura 5 -** Diâmetro do caule de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de BAP.



O número de brotos (NB) teve incremento linear, com modelo bem ajustado ( $R^2 \geq 90\%$ ; Figura 6). O aumento de uma unidade da concentração de BAP promoveu incremento de 0,29 brotos. (Figura 6).



**Figura 6** - Número de brotos de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de BAP.

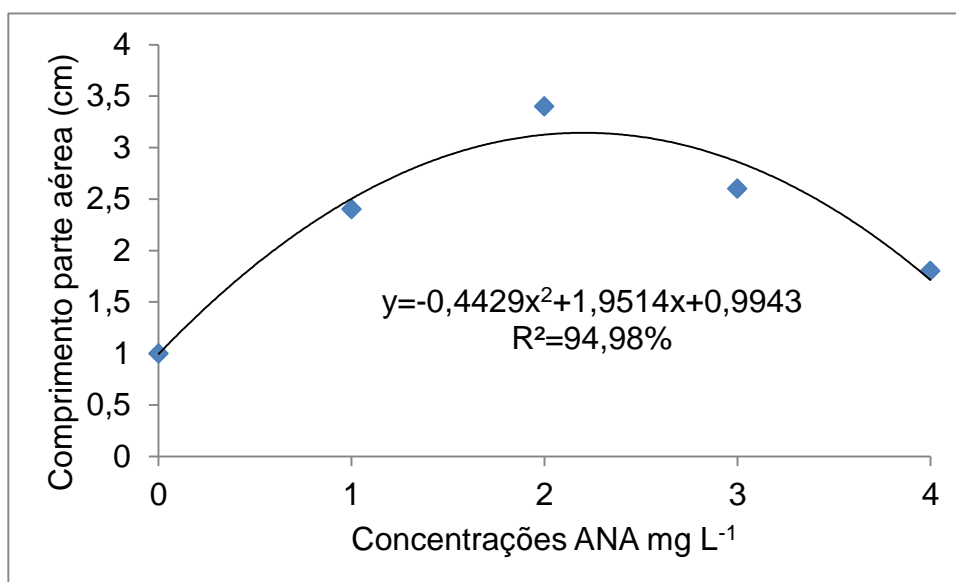
A concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi a mais satisfatória. Porém, concentrações acima de 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP pode potencializar a multiplicação de barueiro. Os níveis endógenos de citocininas do explante (AC) não foram suficientes para potencializar o processo morfogênético. Fato constatado com a testemunha, que não promoveu a multiplicação.

É possível que o explante tenha apresentado concentrações endógenas de auxinas maiores, que podem ter desfavorecido o balanço hormonal para a formação de brotos. A brotação é geralmente inibida por altas concentrações de auxinas que, utilizada na indução do alongamento e enraizamento, pode afetar negativamente a formação de brotos (PASQUAL, 2001). Fato que pode ser confirmado com concentração menor que 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, que possibilitou a melhor resposta para comprimento da raiz e diâmetro do caule.

Os hormônios, substâncias produzidas pela própria planta, em concentrações baixas, promovem, inibem ou modificam qualitativamente o crescimento, geralmente em um local diferente daquele onde foi produzido, no caso das citocininas nas raízes (FERRI,

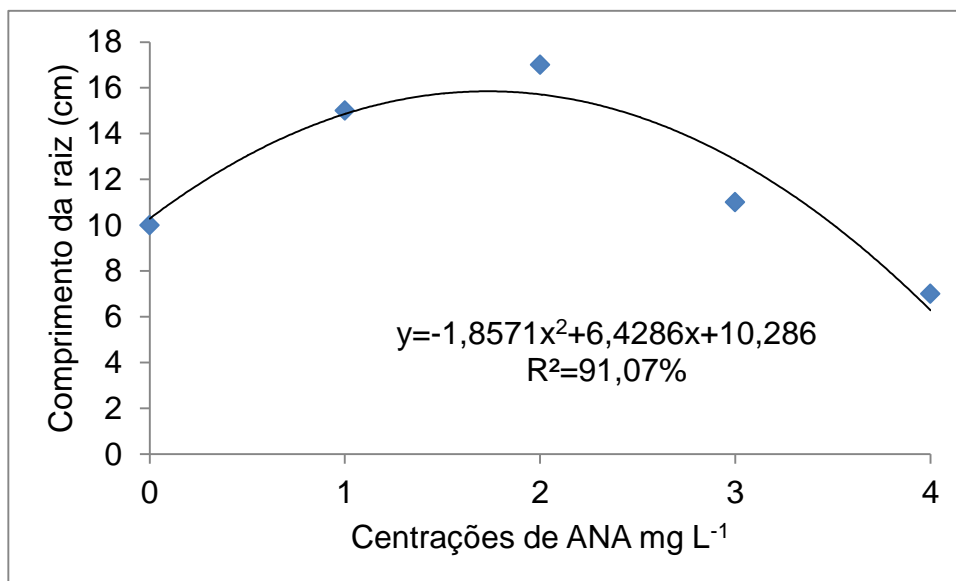
1986), o que leva a conclusão que o AC da planta de barueiro *in vitro* possui concentrações endógenas baixa de citocinina, o que ocasionou menor desenvolvimento dos brotos. Neste âmbito, o balanço hormonal entre concentrações endógenas e exógenas de citocininas é um fator de suma importância para o sucesso em sistemas de micropropagação, o qual tem como principal objetivo induzir a alta taxa de multiplicação (PERES, 2002).

O comprimento de parte aérea de plantas de barueiro possui comportamento quadrático, com bom ajuste ( $R^2 = 94,98\%$ ) (Figura 7). A concentração  $2,20 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA propicia melhor comprimento de parte aérea de barueiro, promovendo comprimento de parte aérea igual a  $3,14 \text{ cm}$  de comprimento (Figura 7).



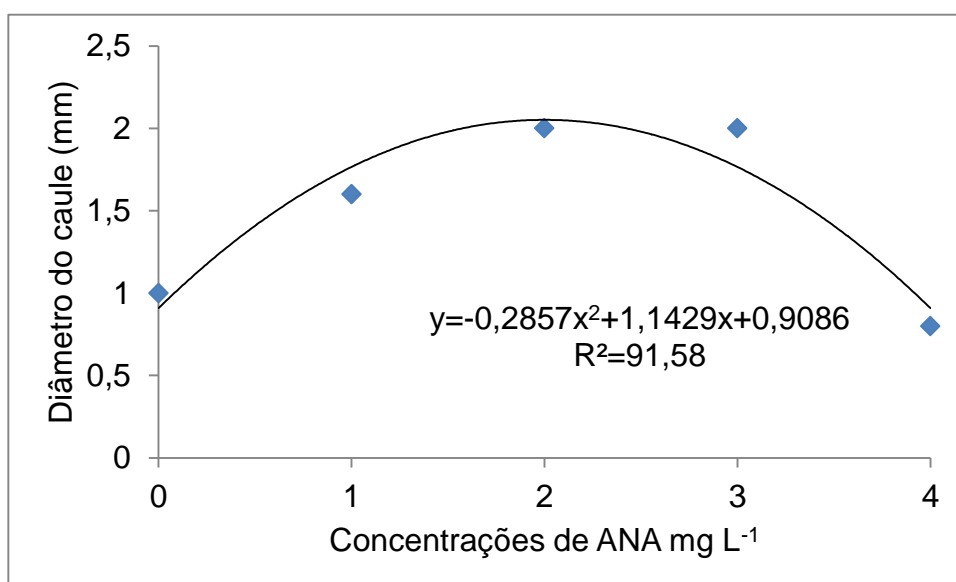
**Figura 7** - Comprimento da parte aérea de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.

O comprimento de raiz de barueiro possui comportamento quadrático, com bom ajuste ( $R^2 = 91,07\%$ ) (Figura 8). A concentração  $1,73 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA propicia melhor desenvolvimento de raiz primária de barueiro, com  $15,84 \text{ cm}$  de comprimento (Figura 8).



**Figura 8** - Comprimento da maior raiz de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.

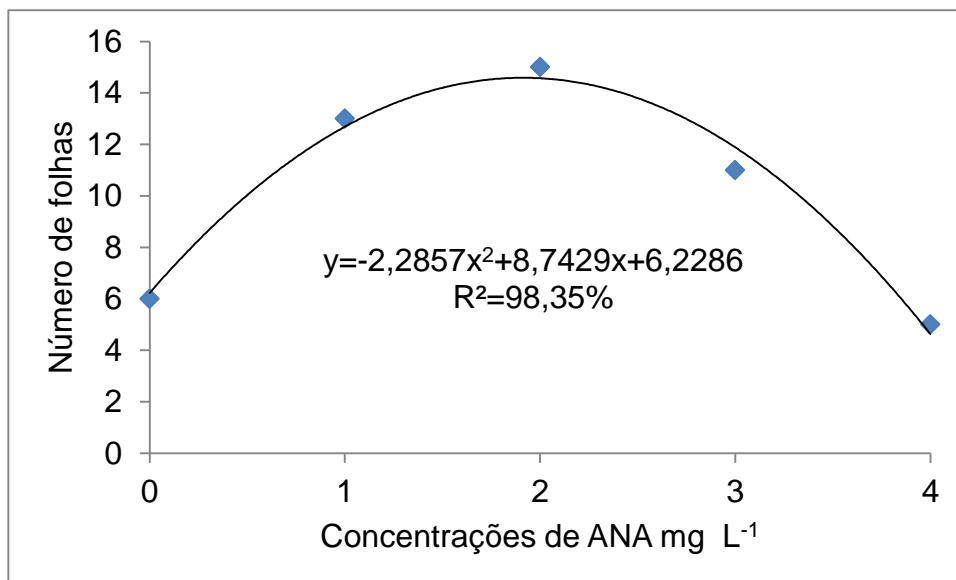
O diâmetro do caule de plantas de barueiro possui comportamento quadrático, com bom ajuste ( $R^2 = 91,58\%$ ) (Figura 9). A concentração de 2,00 mg L<sup>-1</sup> de ANA propicia melhor desenvolvimento do diâmetro do caule (2,05mm) de barueiro.



**Figura 9** - Diâmetro do caule de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.

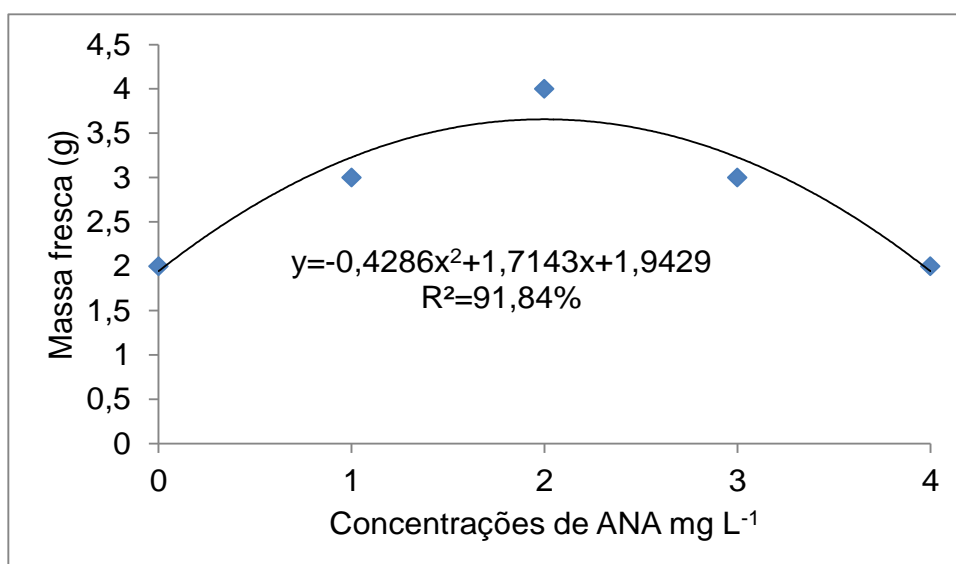
O número de folhas de plantas de barueiro possui comportamento quadrático, com bom ajuste ( $R^2 = 98,35\%$ ) (Figura 10). A concentração 1,91 mg L<sup>-1</sup> de ANA aumentou

de o número de folhas de plantas de barueiro. Esta dose promoveu 14,58 g de massa fresca (Figura 10).



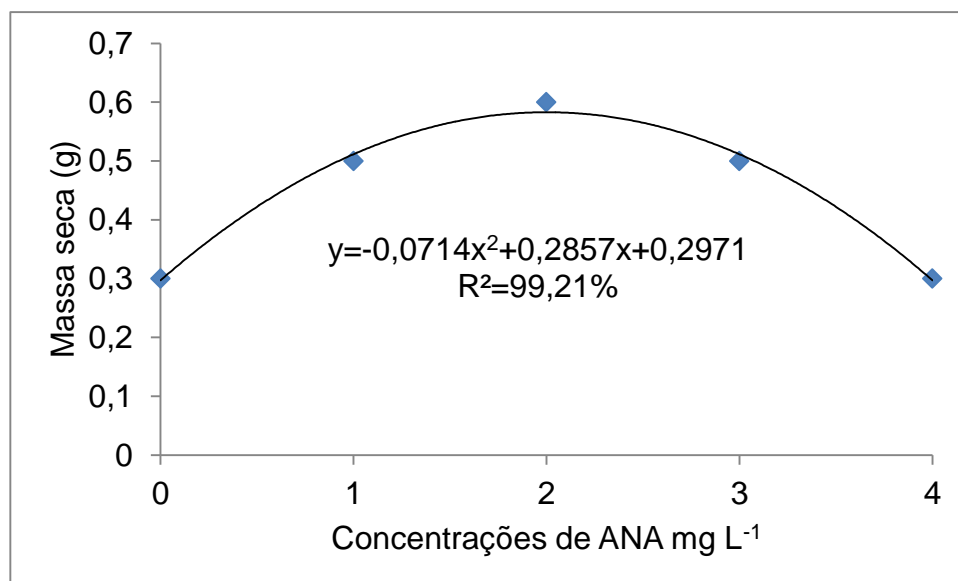
**Figura 10** - Número de folhas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.

A massa fresca de plantas de barueiro possui comportamento quadrático, com bom ajuste ( $R^2 = 91,84\%$ ) (Figura 11). A concentração 1.99mg L<sup>-1</sup> de ANA aumento de massa fresca de plantas de barueiro. Esta dose promoveu 3.65g de massa fresca (Figura 11).



**Figura 11-** Massa fresca de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.

A massa seca de plantas de barueiro possui comportamento quadrático, com bom ajuste ( $R^2 = 99,21\%$ ) (Figura 12). A concentração 2,00 mg L<sup>-1</sup> de ANA aumentou a massa seca de plantas de barueiro. Esta dose promoveu 0,79g de massa seca (Figura 12).



**Figura 12-** Massa seca de plantas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes concentrações de ácido naftalenoacético.

É perceptível a influência do ANA e AIB no alongamento e enraizamento *in vitro* das plantas de barueiro, com melhor CPA de 3,14 cm e CR 15,84 cm. Estes resultados estão de acordo com trabalhos encontrados na literatura, que apontam a necessidade da inclusão de auxina aos meios de alongamento e enraizamento de espécies frutíferas, como ameixeira cv. Santa Rosa (MAGALHÃES; PETERS, 1991), pereira cv. carrick (LEITE et al., 1994) e macieira cv. Fred Hough (CENTELLAS et al., 1999). Tais características são fundamentais, para o sucesso da sobrevivência das plantas na aclimatização, fase bastante delicada, apontada como uma das mais críticas do processo de regeneração, em que ocorre a maioria das perdas. Durante esse estágio, as microplantas são expostas a mudanças súbitas nas condições ambientais (SUTTER, 1988; VANTELGEN et al., 1992; DÍAZ-PEREZ et al., 1995). Segundo Assis e Teixeira (1998), as auxinas são as principais responsáveis pela rizogênese, sendo o ANA e o AIB as mais utilizadas, principalmente em plantas lenhosas. O que confirma os resultados aqui encontrados, em que a adição de auxina nas concentrações até 2,20 mg L<sup>-1</sup> foi essencial para a etapa de alongamento e 1,73 mg L<sup>-1</sup> no enraizamento *in vitro* de barueiro, mas em concentrações acima de 2,20 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporciona menor crescimento desta espécie. Para Fachinello et al. (1994), o aumento da concentração de auxinas aplicadas nas plantas *in vitro* provoca

efeito estimulador de raízes até um certo valor, a partir do qual acréscimos maiores têm efeito inibitório. Resultados com lenhosas confirmam isto, como brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh), cv. Fred Hough (CENTELLAS et al., 1999), *Eugenia pyriformis* Cambes (NASCIMENTO et al., 2008), tiveram efeito inibidor nas maiores concentrações desses regulador.

Como os explantes utilizados foram ápice caulinar (AC) e a dominância apical das auxinas é predominante, pois são fabricadas pelo meristema apical, favorecendo o crescimento do caule e da raiz favorecendo o processo de alongamento das células vegetais. Quando a planta apresenta baixa quantidade de auxinas, as raízes podem crescer, o que foi evidenciado na concentração  $1,73\text{mg L}^{-1}$  de ANA, que proporcionou melhor desenvolvimento da raiz primária de barueiro. Esta dose promoveu raiz com 15,84 cm de comprimento (Figura 2). Porém o caule necessitou de concentração maior de  $2,00\text{mg L}^{-1}$  de ANA para expressar o maior desenvolvimento do diâmetro, com 2,05 mm (Figura 3). A concentração adequada depende da espécie e do teor da auxina existente nela (WAREING; PHILLIPS, 1981; SOUZA et al., 2006; COSTA et al., 2009).

Os resultados aqui encontrados indicam que provavelmente explantes de barueiro possuem elevado teor endógeno de auxina, uma vez que o incremento de doses, mencionadas como baixas na literatura para espécies lenhosas (KRIKORIAN, 1991; RADMANN et al., 2009; COSTA et al., 2009), proporcionou efeito fitotóxico, evidenciado pelo suprimir do desenvolvimento da planta. Isto fica mais evidente ao se pensar que o desenvolvimento desta espécie, mesmo na ausência de ANA, foi inexpressivo.

#### 4. CONCLUSÕES

A concentração de  $4\text{ mg L}^{-1}$  de BAP foi a mais satisfatória. Porém, concentrações acima podem potencializar a multiplicação de barueiro.

No alongamento e enraizamento, concentrações de ANA menores que  $3\text{ mg L}^{-1}$  mostraram-se favoráveis para o desenvolvimento *in vitro* de *Dipterex alata*.

## REFERÊNCIAS

- ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI, v. 1, 1998. p. 261-296.
- CENTELLAS, A. Q., FORTES, G. R. L., MÜLLER, N. T. G., ZANOL, G. C., FLORES, R., GOTTINARI, R. A., **Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira** Pesquisa agropecuária. Brasileira. vol.34, nº. 2 Brasília, 1999.
- CID, L. P. D.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2010. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 122).
- COSTA, M.A.P.C.; PEREIRA, M. J.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M.O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídeas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. Cruzdas Almas: EMBRAPA MFT, 2009. p. 351-370.
- CUNHA, G. A. P. **Nova tecnologia para o controle da fusariose do abacaxizeiro**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, DEZ 2003.
- DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SUTTER; E.G.; SHACKEL, K.A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum, Copenhagen**, v. 95, p. 225-232, 1995.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMMAN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPel, 1994. 179p.
- FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal** 1. 2ª ed. São Paulo: EPU, 1986.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture: the technology. 1.ed. **Dordrecht: Springer**, 1993. 574p.

GONÇALVES, P.S.L. **Divergência genética e efeito do nitrogênio total no crescimento *in vitro* de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes).** 2002. 83p.:11 Dissertação (Mestrado) - Lavras: UFLA, 2002.

GRATTAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagacao in: TORREA, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A., **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, p. 184-250, 1998.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.41-77.

LEITE, D.L.; PETERS, J.A.; FORTES, G.R.de L.; NAKASU, B.H. Micropropagação de pereira (*Pyrus* spp.) cultivar Carrick. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal–SP, v.16, n.1, 236-241, 1994.

MAGALHÃES Jr. A.M.; PETERS, J.A., Cultura *in vitro* de ameixeira: Efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina/PR, v.3, n.1, p.57-61, 1991.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431p.

MUDAY, G. K.; RAHMAN, A.; BINDER, B. Auxin and ethylene: collaborators or competitors. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 4, p. 181-195, 2012.

MULLER, D.; LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. **Annals of Botany**, v. 107, p.1203–1212, 2011.

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

NASCIMENTO A. C. , PAIVAB, R. , NOGUEIRA, C. R. , PORTOD, J. M. P., NOGUEIRA, G. F. , SOARES, F. P., Bap e aib no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223-228, abr./jun. 2008.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.



PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 25: 44–48, 2002.

PERNISOVÁ, M., KUDEROVÁ, A.; HEJÁTKO, J. Cytokinin and auxin interactions in plant development: metabolism, signalling, transport and gene expression. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, p.137–147, 2011.

PIERIK, R.L.M. *In vitro* Cultures of Higher Plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers PIERIK, R.L.M.; VOORST, A.; BOOY, G.; ACKER, C.A.M.; LELIVELT, C.L.C.; WIT, J.C. (1988) Vegetative propagation of Alstromeria hybrids *in vitro*. **Acta Horticulturae** v. 226, p.81-89, 1997.

RADMANN, E. B., BIANCHI, V. J., OLIVEIRA, R. P., JOSÉ CARLOS FACHINELLO, J. C., Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto ‘tsukuba 1’(Prunus persica L.)1 **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p. 656-663, Setembro 2009.

RAHMAN, A. **Auxin: a regulator of cold stress response**. *Physiologia Plantarum*, v. 147, p. 28–35, 2013.

SALISBURY, F.; ROSS, C. **Fisiología de las plantas** - Desarrollo de las Plantas y Fisiologia Ambiental. Madrid, Thomson Edited Spain Paraninfo, v. 3, 2006, 460p.

SOUZA, A. D. S.; COSTA, M. A. P. D. C.; SANTOS-SEREJO, J. A. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. D.S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução a micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa, 2006.

STOYNOVA, B.E. Cell division and cell expansion in cotyledons of arabidopsis seedlings. **New Physiologist**, v.162, p.471, 2004.

SU, Y. H., LIU, Y. B. ; ZHANG, X. S. **Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development**. *Mololecular Plant*, v. 4, p. 616–625, 2011.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Washington, v.113, n.2, p.234-238, 1988.

TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges através de métodos *in vitro***. 1992. 121p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

VANTELGEN, H.J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.41, n.4, p.453-459, 1992.

WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. 3.ed. Oxford, England: Pergamon Press, 1981. 343p

