

HERNANE FERNANDES PINHAL

FITORREGULADORES NO CULTIVO *IN VITRO* DE GABIROBEIRA
(*Campomanesia* spp.) E BARUZEIRO (*Dipteryx alata* VOG.)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

HERNANE FERNANDES PINHAL

FITORREGULADORES NO CULTIVO *IN VITRO* DE GABIROBEIRA
(*Campomanesia* spp.) E BARUZEIRO (*Dipteryx alata* VOG.)

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

Orientador

Prof. Dr. Berildo de Melo

Coorientadora

Dr^a. Simone Abreu Asmar

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

P654f
2017 Pinhal, Hernane Fernandes, 1987
 Fitorreguladores no cultivo in vitro da gabirobeira (*Campomanesia*
 spp.) e baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) / Hernane Fernandes Pinhal. -
 2017.
 64 p. : il.

 Orientador: Berildo de Melo.
 Coorientadora: Simone Abreu Asmar.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Agronomia.
 Inclui bibliografia.

 1. Agronomia - Teses. 2. Cultivo in vitro - Teses. 3. Frutas dos
 cerrados - Teses. 4. Poliaminas - Teses. I. Melo, Berildo de. II. Asmar,
 Simone Abreu. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
 Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU: 631

HERNANE FERNANDES PINHAL

FITORREGULADORES NO CULTIVO *IN VITRO* DE GABIROBEIRA
(*Campomanesia* spp.) E BARUZEIRO (*Dipteryx alata* VOG.)

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

APROVADA em 29 de junho de 2017.

Dr^a. Simone Abreu Asmar
(coorientadora)

UFU

Dr^a. Elequisandra da Costa Araruna

Pesquisadora

Prof. Dr^a. Muza do Carmo Vieira

IFG

Prof. Dr. Heliomar Baleeiro de Melo Júnior

IFTM

Prof. Dr. Berildo de Melo
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Para os meus pais

Para Iza

“Nem todos os que vagueiam estão perdidos”

J.R.R. TOLKIEN

The Lord of The Rings

AGRADECIMENTOS

No fim, acabou sendo uma longa jornada. Cheia de momentos fantásticos. Também períodos difíceis, mas esses, mesmo sem a intenção, vão se apagando da memória. Provavelmente, daqui a um tempo, o que vai restar será apenas a lembrança de que tudo foi ótimo e, na verdade, já é assim que penso. Foi mesmo tudo ótimo.

Mas nada aconteceria se não fossem participações fundamentais em todas as etapas. Por isso, agradecer aqui não é uma ação protocolar, é algo essencial.

Agradecer a Deus em um documento formal, por vezes, não me parece a melhor maneira. Porém, se não mencionasse aqui, a história estaria incompleta, afinal, foram tantas coincidências e situações que se encaixaram para que eu chegasse até esse ponto, que a ação divina não poderia ser mais perceptível. A Deus, muito obrigado.

Gostaria de agradecer a todos os que estiveram, de maneira direta, envolvidos em meu processo de formação e na conclusão desse trabalho:

Ao Prof. Berildo, pela compreensão, pela parceria e pelas grandes oportunidades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (UFU), pelo estímulo para o sucesso dessa etapa e por sempre ter deixado as portas abertas.

A FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo suporte fundamental, que reforçou em mim, a convicção de que o apoio à pesquisa e a educação tem poder transformador sobre as pessoas e sobre a sociedade.

Aos grandes professores, que foram inspiração e incentivo.

A Elequisandra por toda amizade e colaboração desde o início da caminhada.

Ao Pedro, que teve papel crucial para que o trabalho tivesse seu início.

Ao Herick que, aparentemente, veio de Montes Claros com a missão de prestar ajuda incansável a todos.

A Sabrina e a Danyela, pela ajuda e pela generosidade.

A Simone, por toda colaboração nesse trabalho, mas, especialmente, pelo incentivo preciso e fundamental que tornou tudo possível.

Aos demais membros da banca: Dr^a. Musa do Carmo Vieira e Dr. Heliomar Baleeiro de Melo Júnior, por toda a disposição e pelos conselhos valiosos.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia, da Fazenda Água Limpa e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Agradeço também aqueles que, apesar de não estarem, prioritariamente, envolvidos neste projeto, deram todo o sentido a ele:

Aos meus pais, que com abdicação e esforço incessante, deram a um filho o melhor presente que pode existir: A oportunidade de buscar seus sonhos.

A Iza, que com seu amor, companheirismo, habilidades automobilísticas e força de vontade em detrimento da força do sono, colaborou em todas as conquistas. Espero poder fazer o mesmo. Sempre.

A família, pela torcida constante e sincera. Pela presença certa e apoio infalível.

Aos amigos, que, no fim, são aqueles que estão comigo nos momentos mais felizes, justamente por serem os responsáveis por essa felicidade.

Por último e em especial, agradeço ao Instituto de Ciências Agrárias e a Universidade Federal de Uberlândia que me acolheu nos últimos 12 anos e transformou a minha vida. Me fez crescer como pessoa e me tornou um profissional. Me deu amigos para toda uma vida e me fez vivenciar experiências incríveis. Me mostrou e me fez valorizar o poder e a importância da educação. Graças a isso, sigo em frente, com alegria pelas lembranças, já com um pouco de saudade e com esperança pelo há de vir.

“Vá então, há outros mundos além deste”

Stephen King

O Pistoleiro – A Torre Negra Vol. I

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | I |
| ABSTRACT..... | II |
| CAPÍTULO I..... | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| REFERÊNCIAL TEÓRICO GERAL..... | 3 |
| 2.1 Biomas brasileiros..... | 3 |
| 2.2 Cerrado..... | 4 |
| 2.3 Fruteiras nativas do Cerrado..... | 5 |
| 2.3.1 A gabirobeira..... | 8 |
| 2.3.2 O baruzeiro..... | 9 |
| 2.4 Cultura de Tecidos Vegetais..... | 10 |
| 2.4.1 Meio de cultivo..... | 10 |
| 2.4.2 Fitorreguladores..... | 11 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 13 |
| CAPÍTULO II..... | 19 |
| POLIAMINAS NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA GABIROBEIRA (<i>Campomanesia</i> spp.)..... | 19 |
| RESUMO..... | 19 |
| ABSTRACT..... | 20 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 25 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 30 |
| 5 CONSIDERAÇÃO FINAL..... | 31 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 32 |
| CAPÍTULO III..... | 33 |
| FITORREGULADORES NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO BARUZEIRO (<i>Dipteryx alata</i> Vog.)..... | 33 |
| RESUMO..... | 33 |
| ABSTRACT..... | 34 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 35 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 2.1 Experimento 1..... | 37 |
| 2.2 Experimento 2..... | 38 |
| 2.3 Experimento 3..... | 39 |
| 2.4 Experimento 4..... | 40 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 42 |
| 3.1 Experimento 1..... | 42 |
| 3.2 Experimento 2..... | 46 |
| 3.3 Experimento 3..... | 48 |
| 3.4 Experimento 4..... | 52 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 59 |
| 4.1 Experimento 1..... | 59 |
| 4.2 Experimento 2..... | 59 |
| 4.3 Experimento 3..... | 59 |

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 4.4 Experimento 4..... | 59 |
| 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 60 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1. Resumo da análise de variância para o comprimento (cm), número de folhas, teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), massa seca (mg), massa fresca (mg) e teor de água de explantes (%) de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) em meios de cultivo com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.25

CAPÍTULO III

TABELA 1. Resumo da análise de variância para o comprimento da parte aérea – CPA (cm), comprimento das raízes - CR (cm), número de folhas, número de brotações basais, número de brotações superiores, número de brotações totais, teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), massa fresca da parte aérea – MFPA (g), massa fresca das raízes – MFR (g), massa seca da parte aérea – MSPA (g), massa seca das raízes – MSR (g) e teor de água (%) no cultivo *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meio contendo diferentes de fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.....42

TABELA 2. Resumo da análise de variância para o comprimento - COMP (cm); número de folhas; teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$); massa fresca da parte aérea – MFPA (g); massa fresca das raízes – MFR (g); massa seca da parte aérea – MSPA (g); massa seca das raízes – Msr (g); número de brotações basais por explante - BB; número de brotações superiores por explante - BS e número de brotações totais por explante - BT no cultivo *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meios com diferentes doses de BAP com ou sem a adição de ANA. Uberlândia, MG, 2017. 47

TABELA 3. Resumo da análise de variância para o comprimento das brotações – CB (cm), número de ramos, número de folhas, teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), massa fresca das brotações – MFB (g); massa seca das brotações – MSB (g); número de brotações grandes por explante - BG; número de brotações pequenas por explante - BP e número de brotações totais por explante - BT na multiplicação *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meio contendo diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.48

TABELA 4. Resumo da análise de variância para o comprimento das brotações (cm), número de ramos, número de folhas, teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), massa fresca das brotações – MFB (g); massa seca das brotações - MSB (g); número de brotações grandes por explante - BG; número de brotações pequenas por explante - BP e número de brotações totais por explante - BT na multiplicação *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meio contendo diferentes concentrações de BAP e ANA. Uberlândia, MG, 2017.52

TABELA 5. Características de desenvolvimento do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) *in vitro* em meios de cultivo com 0,25 ou 0,5 mg L⁻¹ de ANA e doses variadas de BAP (mg L⁻¹). Uberlândia, MG, 2017.53

TABELA 6. Brotações na multiplicação *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meios de cultivo com 0,25 ou 0,5 mg L⁻¹ de ANA e doses variadas de BAP (mg L⁻¹). Uberlândia, MG, 2017.53

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Comprimento da parte aérea - CPA (cm), número de folhas e teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$) em explantes de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) cultivados em meios contendo doses variadas de diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.28

FIGURA 2. Massa fresca – MF (mg), massa seca – MS (mg) e teor de água (%) em explantes de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) cultivados em meios contendo doses variadas de diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.29

CAPÍTULO III

FIGURA 1. Brotações de explantes de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) *in vitro*. a) brotações basais no estabelecimento a partir de sementes; b) brotações superiores no estabelecimento a partir de sementes; c) brotações grandes no cultivo de segmentos nodais; d) localização das brotações basais no cultivo a partir de sementes; e) brotação pequena no cultivo de segmentos nodais. Uberlândia, MG, 2017.41

FIGURA 2. Massa fresca e seca das raízes (g) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) para diferentes fitorreguladores. uberlândia, mg, 2017.43

FIGURA 3. Comprimento da parte aérea – CPA (cm) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) para diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.44

FIGURA 4. Brotações totais, basais e superiores por explante no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) para diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.46

FIGURA 5. Massa fresca da parte aérea – MFPA (g) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) para diferentes doses (mg L^{-1}) de BAP. Uberlândia, MG, 2017.47

FIGURA 6. Massa fresca das brotações (g) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017. ..49

FIGURA 7. Massa seca das brotações (g) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.....49

FIGURA 8. Brotações pequenas no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.....50

FIGURA 9. Brotações totais no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.50

FIGURA 10. Comprimento das brotações (cm) em diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,25 (a) ou 0,5 mg L⁻¹ (b) de ana na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.54

FIGURA 11. Massa fresca das brotações – MFB (mg) por explante em diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,25 mg L⁻¹ de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.55

FIGURA 12. Número de ramos por explante em diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,5 mg L⁻¹ de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.55

FIGURA 13. Brotações grandes por explante em diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,25 mg L⁻¹ de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.57

FIGURA 14. Brotações pequenas e brotações totais por explante em diferentes concentrações de BAP em combinação 0,5 mg L⁻¹ de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.57

RESUMO

PINHAL, HERNANE FERNANDES. **Fitorreguladores no cultivo *in vitro* de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) e baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.).** 2017. 64p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

A gabirobeira (*Campomanesia* spp.) e o baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog) são duas fruteiras nativas do Cerrado com grande potencial devido ao seu aproveitamento alimentar e suas múltiplas possibilidades de utilização. A cultura de tecidos pode colaborar tanto para o cultivo quanto para a preservação destas espécies. Assim, neste trabalho, foram realizados experimentos com diversos fitorreguladores no cultivo *in vitro* das duas fruteiras. No experimento feito com a gabirobeira, foram testadas três poliaminas (espermina, espermidina e putrescina) em duas concentrações (0,5 e 1,0 mg L⁻¹) para a multiplicação *in vitro* da gabirobeira utilizando, como explantes, segmentos nodais de plantas estabelecidas *in vitro*. Os resultados mostraram que as poliaminas não foram eficientes no desenvolvimento dos explantes de gabirobeira. Porém, o subcultivos de segmentos nodais pode funcionar como método de multiplicação *in vitro* da gabirobeira. Já nos estudos relacionados ao baruzeiro, foram realizados trabalhos comparando a ação de sete fitorreguladores (espermina, espermidina, putrescina, 2iP, cinetina, zeatina e BAP) e também a combinação de doses de BAP e ANA na multiplicação *in vitro* do baruzeiro, utilizando dois tipos de explantes: sementes e segmentos nodais de plantas estabelecidas *in vitro*. Para as sementes, a zeatina foi o fitorregulador que proporcionou a formação do maior número de brotações, enquanto a variação das doses de BAP e o uso de ANA não foram efetivos para a multiplicação *in vitro*. Quando os explantes utilizados foram segmentos nodais, a espermina foi o fitorregulador que, isoladamente, favoreceu a maior taxa de brotações por explante, enquanto a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 12 mg L⁻¹ de BAP mostrou-se a mais promissora para gerar brotações em segmentos nodais de baruzeiro. Assim, os dados aqui apresentados são importantes para a multiplicação *in vitro* da gabirobeira e do baruzeiro e podem subsidiar estudos futuros a relacionados ao tema.

Palavras-chave: Poliaminas. Citocininas. Fruteiras do Cerrado.

¹ Comitê Orientador: Berildo de Melo – UFU (Orientador) e Simone Abreu Asmar – UFU.

ABSTRACT

PINHAL, HERNANE FERNANDES. **Growth regulators on *in vitro* cultivation of the gabirobeira (*Campomanesia* spp.) and baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.).** 2017. 64p. Thesis (Doctorate in Agronomy/ Crop Sciences) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

The gabirobeira (*Campomanesia* spp.) and the baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) are fruit trees native to the Brazilian Cerrado, both present great potential due to the value of their fruits as food and their multiple possibilities of usage. Tissue cultures can collaborate not only on cultivation, but also on the preservation of these species. Thereby, experiments with different growth regulators on *in vitro* cultivation of both fruit trees were performed in this work. In the experiment performed on the gabirobeira, three polyamines (spermine, spermidine and putrescine) in two concentrations (0.5 and 1.0 mg L⁻¹) – designated to *in vitro* multiplication of the gabirobeira – were tested using nodal segments from plants established *in vitro* as explants. The results showed that polyamines were not efficient for the development of the gabirobeira explants. However, nodal segment subculturing can work as a method for *in vitro* multiplication of the gabirobeira. Furthermore, in the studies related to the baruzeiro, experiments were performed comparing the action of seven growth regulators (spermine, spermidine, putrescine, 2iP, kinetin, zeatin and BAP) and the combination of doses of BAP and NAA on *in vitro* multiplication of the baruzeiro, in which two types of explants were used: seeds and nodal segments from plants established *in vitro*. For seeds, zeatin was the growth regulator that provided the generation of the greatest number of shoots, whereas the variation of BAP doses and the use of NAA were not effective for *in vitro* multiplication. When nodal segments were used as explants, spermine was the growth regulator to single-handedly provide the highest rate of shoot formation per explant, whereas the combination of 0.5 mg L⁻¹ of NAA and 12 mg L⁻¹ of BAP revealed itself to be the most promising for the shoot induction in nodal segments from the baruzeiro. Therefore, the mentioned data are important to *in vitro* multiplication of the gabirobeira and the baruzeiro, and it can also support future research concerning the subject.

Keywords: Polyamines. Cytokinins. Cerrado fruit trees.

¹ Guidance Committee: Berildo de Melo – UFU (Major Professor) and Simone Abreu Asmar - UFU.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é um bioma fundamental para a preservação ambiental no Brasil, pois, além de possuir uma das maiores biodiversidades e ocupar boa parte do território, servindo como ponto de ligação entre outros biomas, está situado em regiões onde há grandes polos agrícolas. Sabendo que a agricultura é um dos pilares da economia nacional, uma alternativa para preservação e aproveitamento econômico está na valorização de espécies nativas que podem propiciar retorno comercial, como é o caso de determinadas fruteiras nativas do Cerrado.

A gabirobeira (*Campomanesia* spp.) e o baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) são duas das fruteiras que apresentam grande potencial de aproveitamento, com a utilização de seus frutos e sementes na alimentação, bem como nas áreas de paisagismo, medicinal e no cultivo visando à preservação ambiental (ALVES, 2004; VALLILO et al., 2006; SUGUINO et al., 2009).

A cultura de tecidos vegetais tem a capacidade de fornecer subsídios tanto na preservação quanto no cultivo. E isso porque é possível, entre outras coisas, realizar a conservação de germoplasma *in vitro* e a produção de mudas de elevada qualidade com baixo custo e espaço e mão de obra reduzidos. A cultura de tecidos também é uma ferramenta no melhoramento de plantas, na engenharia genética e no controle sanitário de mudas (LAMEIRA et al., 2000; ANDRADE, 2002; CARVALHO; VIDAL, 2003).

Com o objetivo de aprimorar as técnicas de cultura de tecidos já desenvolvidas para as duas espécies, há dois pontos interessantes a serem abordados. Um é a ação de diferentes reguladores de crescimento, de modo especial as poliaminas, moléculas que têm uso relativamente recente como fitorreguladores. Outra questão é o uso de explantes provenientes de plantas adultas, o que constitui um dos grandes desafios nessa área, devido à dificuldade de adaptação das plantas nativas ao ambiente *in vitro* e ao excesso de contaminações.

O maior problema ao se trabalhar com o cultivo *in vitro* de espécies nativas está na reduzida quantidade de informações relacionadas ao assunto. A complexidade da interação entre essas espécies e a cultura de tecidos faz com que diversos estudos não

cheguem a suas etapas finais com resultados positivos. Assim, não há uma divulgação satisfatória do desenvolvimento desses trabalhos, o que serviria como base para outros pesquisadores. Percebe-se que a elaboração de um protocolo de cultivo *in vitro* para uma nova espécie é um processo que pode ser longo e complexo, ainda mais levando em consideração as várias ramificações que o tema pode ter. O envolvimento de um maior número de profissionais, de diferentes locais e áreas de atuação pode acelerar o estudo nesse seguimento. Dessa forma, esta tese teve o objetivo de compilar informações obtidas por meio de experimentos com o cultivo *in vitro* da gabirobeira e do baruzeiro para que esses estudos tragam soluções para algumas questões ou contribuam para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAL TEÓRICO GERAL

2.1 Biomas brasileiros

Ao longo do tempo, a definição de bioma foi discutida e reformulada. É possível defini-lo como uma área com mais de um milhão de quilômetros quadrados com macroclima e uma fitofisionomia uniformes e a presença de organismos vivos comuns associados à área. Além disso, é possível considerar fatores como altitude, solo, fogo, dentre outros para a classificação do bioma. Todas as características desses ambientes lhes conferem propriedades particulares. A grande diversidade ambiental encontrada no Brasil faz com que existam aqui diversos biomas, sendo que aqueles tidos como principais podem ser caracterizados como um complexo de biomas (COUTINHO, 2006).

O Brasil possui seis biomas continentais definidos: a Amazônia, o maior bioma do país, com mais de 2.500 espécies de árvores, 30 mil de plantas e 4.196.943 Km², área equivalente a 49,29% do território nacional; o Cerrado, citado como a savana mais rica em biodiversidade no mundo, com 2.036.448 Km² (23,92% da área total); a Mata Atlântica, Patrimônio Nacional, com 1.110.182 Km² (13,04% da área total); a Caatinga, que apresenta o clima semiárido típico do sertão nordestino e 844.453 Km² (9,92% da área total); o Pampa, presente na região Sul em diferentes paisagens naturais, com 176.496 Km² (2,07% da área total) e o Pantanal, uma das maiores extensões úmidas contínuas encontradas no planeta, ocupando 150.355 Km² (1,76% da área total) (IBGE, 2004; BRASIL, 2016).

O levantamento realizado pela EMBRAPA (2006) mostra a importância ecológica e socioeconômica dos biomas brasileiros e cita práticas destinadas à sua valorização e preservação: na Amazônia, trabalhos com manejo florestal de impacto reduzido, bem como o estudo e valorização dos produtos florestais; na Caatinga, a pesquisa relacionada ao potencial econômico de espécies nativas, em especial fruteiras, forrageiras e vegetais de uso múltiplo; no Pantanal, o estímulo a sistemas de produção pecuários sustentáveis, recuperação de áreas de pastagens nativas e a conservação dos recursos pesqueiros; no Pampa, práticas que modernizem a atividade pecuária e, assim, colaborem na preservação e manejo de pastagens naturais; na Mata Atlântica, que possui áreas degradadas em virtude da intensa ocupação nas regiões onde ela se encontra, propõem-se técnicas de recuperação de áreas, com atenção especial em áreas de preservação permanente (APPs)

e reservas legais; no Cerrado, a valorização de recursos naturais com o uso da flora nativa em sistemas de manejo sustentável, extrativistas, florestais e agroflorestais, com o destaque ao aproveitamento alimentar de frutos do Cerrado.

2.2 Cerrado

Segundo Coutinho (2006), o Cerrado é um complexo de biomas distribuídos em mosaico. Sendo o domínio do Cerrado formado por diversos tipos de formações vegetais complexas, presentes em locais com variadas características edáficas, mas que estão em um mesmo domínio morfoclimático e fitogeográfico. De acordo com Ribeiro e Walter (1998), o Cerrado apresenta formações florestais, savânicas e campestres, sendo que dentro dessas formações são encontradas diversas fitofisionomias, mostrando a diversidade do bioma.

Considerado o segundo maior bioma sul-americano, o Cerrado ocupa uma área equivalente a 22% do território brasileiro nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rondônia, São Paulo, Tocantins e no Distrito Federal, interpondo-se entre os biomas Amazônia, Pantanal, Mata Atlântica e Caatinga. O clima predominante é o tropical quente subúmido com duas estações bem definidas, uma seca e outra chuvosa (IBGE, 2004; BRASIL, 2016).

O Cerrado apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, sendo que as várias espécies de seres vivos da região interagem para garantir seu desenvolvimento e dispersão, existindo, portanto, uma dependência entre a flora e os demais organismos. Destaca-se, ainda, a presença de algumas das principais bacias hidrográficas nacionais. Graças a isso, bem como à posição geográfica e ao seu caráter edáfico, florístico, faunístico e geomorfológico, o Cerrado tem importância vital no sustento e manutenção ecológica dos principais biomas brasileiros (BASTOS; FERREIRA, 2010).

O estudo realizado por Walter (2006) mostra a riqueza florística do Cerrado ao contabilizar de 132 a 180 famílias botânicas presentes no bioma. O autor, porém, cita a necessidade de esforços para uma maior convergência com relação à taxonomia que proporcione precisão às informações da composição das espécies vegetais do Cerrado, visto que as incertezas nesse tema podem dificultar até mesmo trabalhos para a conservação vegetal nesses ambientes.

O Cerrado é o bioma brasileiro mais afetado pela ocupação humana, sendo que pelo menos 137 espécies de animais endêmicos sofrem ameaça de extinção, enquanto

estima-se que 20% das espécies de vegetais naturais no bioma já não sejam encontradas em áreas protegidas. Mesmo com a sua impressionante biodiversidade, apenas 8,21% do território do Cerrado está protegido por unidades de conservação, o que o torna o bioma brasileiro, com menor percentual de áreas de proteção integral (BRASIL, 2016).

Ocupando uma grande extensão territorial, a área do Cerrado, apresenta uma variada gama de uso e ocupação, com cerca de 12 % da área utilizada para a agricultura, 29% como pastagens, 1,5 % para silvicultura, 0,5% referentes a regiões urbanizadas e, aproximadamente 24% de áreas florestais e 33% de vegetação não florestal, resultando em 54% do bioma ocupado por vegetação natural (BRASIL, 2015).

A região do Cerrado possui grande diversidade vegetal, no entanto, práticas de exploração e preservação inadequadas colocam em risco espécies como as fruteiras nativas, que possuem grande potencial de aproveitamento (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

A utilização de espécies vegetais do Cerrado para o aproveitamento madeireiro, medicinal, industrial e alimentício é um dos pontos que evidencia o potencial de aproveitamento do bioma, uma vez que o uso destas plantas representa uma alternativa comercial para complementar a renda de setores da população da região. O aproveitamento alimentar dessas frutíferas *in natura* ou por meio do processamento dos frutos constitui o foco principal para a sua utilização. No entanto, a ausência de informações básicas à respeito da biologia e utilização agrônômica e florestal de espécies do Cerrado é um fator limitante para a manifestação do seu potencial econômico. Tais informações seriam relevantes para a produção de mudas em viveiros para a preservação e cultivo das espécies nativas (RIBEIRO; SILVA, 1996; ALMEIDA, 1998; ALMEIDA et al., 1998).

2.3 Fruteiras nativas do Cerrado

Há décadas, espécies nativas do Cerrado têm servido à população rural, com seus frutos utilizados na alimentação, além do aproveitamento da madeira e fibras extraídas dessas plantas. Também já foram relatados os usos medicinal, ornamental, como forragem e para extração de óleos. O comércio de algumas frutas como o baru (*Dipteryx alata* Vog.), o araticum (*Annona crassiflora* Mart.), a mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), a cagaita (*Eugenia dysenterica* Mart. Ex. D.C.) e o pequi (*Caryocar brasiliense*

Camb.) tem sido realizado com considerável êxito (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997; DUBOC, 2008).

Outros frutos também são regularmente consumidos e direcionados para a venda em centros urbanos como o buriti (*Mauritia flexuosa*), o bacupari (*Salacia crassifolia*) e o cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*). As múltiplas utilizações se mostram um fator preponderante no aproveitamento de fruteiras do Cerrado, uma vez que espécies nativas são aproveitadas de diversas maneiras, tendo inclusive importância social ao colaborar com a sobrevivência de diversas populações regionais (BRASIL, 2016).

Gonçalves, Duarte e Tsukamoto Filho (2015) citam que, no Mato Grosso, as frutas nativas do Cerrado são utilizadas na alimentação e são ferramentas que colaboram para o ecoturismo. O cultivo dessas plantas é facilitado pelo baixo custo derivado da sua fácil adaptação aos solos em seu estado natural. Seu cultivo também colabora em projetos de reflorestamento e recuperação de áreas. Os autores ainda destacam a promissora possibilidade de inserção das fruteiras nativas em sistemas agroflorestais, uma vez que as espécies fornecem, além da madeira, alimento, aumentando a rentabilidade no processo. No entanto, estudos sobre esse tema ainda são necessários para estimular a prática.

Oliveira e Rocha (2008) abordam a utilização de frutas do Cerrado como incremento à merenda escolar, citando-as como fontes de nutrientes, que poderiam colaborar no combate à desnutrição infantil. Além disso, o baixo custo de obtenção representaria uma opção para a redução de custos, e a presença dessas frutas nas escolas colaboraria na conscientização e valorização do Cerrado.

Diante da necessidade de preservação de áreas naturais, protegidas pelo “Novo Código Florestal” (Lei Federal 12651/12), as fruteiras do Cerrado podem ser uma alternativa de complemento de renda e subsistência utilizando manejo de baixo impacto, com coleta de frutos, resinas e cipós em áreas de preservação permanente (APPs) e reservas legais (RLs), onde também pode ocorrer, desde que obedeça às predisposições legais, o manejo florestal madeireiro sustentável, prática que pode ser realizada com o emprego de espécies de fruteiras do Cerrado com potencial para múltiplos usos (VALLE, 2013).

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense*) é uma espécie que merece destaque, já que produz frutos que estão entre os mais consumidos por populações de baixa renda do Cerrado brasileiro. Proporciona complemento à renda de pequenos produtores e possui grande importância na recuperação de áreas degradadas. Além da importância alimentar, existe a possibilidade do aproveitamento de subprodutos extraídos da planta, como é o

caso da utilização do caroço do fruto para extração de óleo destinado à produção de combustíveis. No entanto, a viabilidade dessa utilização depende da evolução no manejo do pequizeiro e de técnicas efetivas de cultivo da fruteira (KERR; SILVA; TCHUCARRAMAE, 2007; CAMARGO et al., 2014).

A mangabeira (*Hancornia speciosa*) é uma frutífera promissora devido ao seu aproveitamento alimentar e comercialização dos frutos, que possuem características desejáveis para o consumo fresco bem como para a industrialização. A extração de compostos naturais destinados à farmacologia é outro atrativo da espécie. No Nordeste, é uma das plantas nativas mais procuradas para utilização na indústria, em especial para produção de sucos e polpas congeladas. Apesar de seus benefícios, há escassez de informações em relação à mangabeira, desde aspectos botânicos até aqueles relacionados à sua preservação e cultivo (SOARES et al., 2006; NASCIMENTO; CARDOSO; COCOZZA, 2014; ALMEIDA et al., 2016).

A cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) é outra fruteira do Cerrado com potencial para exploração econômica por causa do apreciado consumo da fruta *in natura*, bem como de sua utilização culinária, difundida entre habitantes do Cerrado com a produção de doces, geleias, licores, sorvetes, dentre outros. Para maior difusão da espécie, algumas questões, como a produção de mudas adequadas, devem ser estudadas para estimular a domesticação e o cultivo da cagaiteira. É importante destacar que a espécie possui sementes recalcitrantes e frutos com propriedades laxativas, fatos que devem ser contornados para que ela manifeste o seu potencial econômico (ANDRADE et al., 2003; MARTINOTTO et al., 2008).

O araticunzeiro (*Annona crassiflora*), conhecido também como marolo, é uma fruteira do Cerrado que se mostra promissora em virtude das características positivas de seus frutos, que são fonte de vitamina A, vitamina C, fibras, açúcares e compostos funcionais. Em acréscimo, possui frutos grandes e, apesar da sazonalidade da produção, há bom rendimento de polpa, o que é um estímulo à inserção do araticunzeiro na fruticultura nacional (SILVA; VILAS BOAS; XISTO, 2013; PIMENTA et al., 2014; ARRUDA; PEREIRA; PASTORE, 2017).

Ademais, duas frutíferas nativas do Cerrado possuem destaque: o baruzeiro (*Dipteryx alata*) e a gabirobeira (*Campomanesia* spp.), a primeira pelo aproveitamento da sua amêndoa e seus múltiplos usos e a segunda devido às características organolépticas de seus frutos (VALLILO et al., 2006; VERA; SOUZA, 2009).

2.3.1 A gabirobeira

Gabirobeira é o nome dado à diversas espécies de fruteiras do gênero *Campomanesia*, dentre as quais uma parte é nativa da região do Cerrado. Tais espécies são conhecidas regionalmente por diferentes nomes, como: guabiroba, guabiroba-do-campo ou guavira. Em comum, possuem o fato de apresentarem frutos com considerável aptidão alimentar (PORTO; GULIAS, 2006).

Espécies de *Campomanesia* presentes no Cerrado são descritas como arbustivas de pequeno porte, com folhas com comprimento inferior a 4 cm. Seus frutos são encontrados com diâmetros e comprimentos de poucos milímetros (valores de comprimento entre 13 e 26 mm para *Campomanesia adamantium* e *Campomanesia pubescens*) e massa com valores inferiores a 5 g (OLIVEIRA et al., 2011; MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014; SOBRAL et al., 2015).

Em seus estudos, Vallilo et al. (2006) definem frutos de gabirobeira como suculentos, ácidos, levemente adocicados e de aroma cítrico. Destacam também a possibilidade do seu aproveitamento “in natura” e na indústria, devido ao seu teor ácido e elevado teor de fibras alimentares, minerais e outros compostos de interesse quando o objetivo é processamento de alimentos.

A gabirobeira pode ser aproveitada como planta ornamental, na recuperação de áreas degradadas, além de existirem relatos de sua utilização como planta medicinal (SUGUINO et al., 2009).

Silva et al. (2009) observaram um período de nove semanas desde o florescimento até a colheita dos frutos de gabiroba (*C. pubescens*). Características relacionadas ao desenvolvimento do fruto apresentaram crescimento contínuo. Alterações características identificaram a maturação dos frutos no 43º dia após a abertura das flores. Os autores concluíram que as gabirobas apresentam um comportamento típico de frutos climatéricos.

Os frutos de gabirobeira possuem de 6 a 8 sementes, e são coletados entre setembro e novembro (PORTO; GULIAS, 2006). Em virtude de sua intolerância à secagem, suas sementes podem ser consideradas recalcitrantes (DOUSSEAU et al., 2011).

Oliveira et al. (2011) afirmam que o conhecimento a respeito da espécie é uma importante ferramenta para a implantação de lavouras comerciais, bem como para a sua preservação.

2.3.2 O baruzeiro

O baruzeiro (*Dipteryx alata* Vogel) é uma planta da família Fabaceae, pertencente ao gênero *Dipteryx* Schreb. Trata-se de uma planta arbórea com até 25 m de altura, caule com 40 a 70 cm de diâmetro, folhas compostas por 6 a 12 folíolos com até 12 cm de comprimento, frutos de cor parda de semente única. Outras espécies do gênero possuem valor comercial conhecido por causa da qualidade da madeira extraída das árvores, no entanto a maioria é encontrada em florestas tropicais, sendo *Dipteryx alata* a única espécie observada em ambientes savânicos no Paraguai, Bolívia e Brasil, onde está presente em formações vegetais nos estados do Pará, Rondônia, Maranhão, Piauí, Tocantins, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (LORENZI, 2002; CARRAZZA; ÁVILA, 2010; VILLARROEL, 2015).

É uma fruteira de grande potencial, uma vez que suas sementes são apreciadas pelo sabor e comercializadas com sucesso em feiras regionais, resultando em parte da renda de diversas famílias. Juntamente com seus frutos, possuem qualidades nutricionais benéficas E, além disso, suas múltiplas possibilidades de uso representam um grande atrativo. Possui madeira de qualidade e o endocarpo pode ser utilizado como lenha. É considerada promissora para utilização silvipastoril, pois, além do aproveitamento alimentar e madeireiro, suas folhas, ricas em nitrogênio e cálcio, ao caírem no solo, influenciariam na melhoria de sua qualidade. A planta também é importante na conservação ecológica, uma vez que é fonte de subsistência para diversos animais na época das secas, em que há maior escassez de alimentos. A alta produtividade, facilidade de armazenamento e transporte dos frutos transformam o cultivo comercial do baruzeiro em uma possibilidade interessante, apesar da necessidade de mais informações a respeito da sua biologia e manejo (ALVES, 2004; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

Apesar da utilização da polpa dos frutos, a semente do baruzeiro, também denominada amêndoa, é o principal produto apreciado na alimentação humana, com um sabor semelhante ao do amendoim. Possui qualidades nutritivas interessantes, entretanto as amêndoas devem ser torradas para eliminar a ação de substâncias antinutritivas (TAKEMOTO et al., 2001; NEPOMUCENO, 2006; VERA; SOUZA, 2009).

Os frutos maduros de baruzeiro sofrem queda espontânea das árvores e, nesse ponto podem ser coletados para extração da amêndoa, sendo que a sua obtenção se dá a partir de práticas extrativistas. O comércio das amêndoas é realizado regionalmente e

pode alcançar valores elevados em alguns locais (LORENZI, 2002; NEPOMUCENO, 2006; VERA et al., 2009; VERA; SOUZA, 2009).

Além disso, elas possuem diversas qualidades e, sob o ponto de vista nutricional, podem substituir outras castanhas, como o amendoim, a castanha de caju e a castanha do Brasil. Seu óleo também pode ser utilizado de forma similar aos óleos de soja e azeite de oliva. O uso das amêndoas também é promissor no combate à obesidade (ALVES et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017).

2.4 Cultura de Tecidos Vegetais

Nas técnicas de cultura de tecidos vegetais, segmentos vegetais, denominados explantes, são retirados de uma planta doadora a fim de formar novas plantas em laboratório. Estas são cultivadas *in vitro*, em um meio de cultura que deve oferecer os nutrientes necessários ao seu crescimento, bem como elementos que permitam que a espécie vegetal se adapte ao ambiente *in vitro* e desenvolva as características desejáveis no processo produtivo da planta em questão (CID, 2001).

A micropropagação é uma técnica de cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos vegetais em que os explantes são deixados em meio de cultura asséptico em condições de irradiância, umidade, fotoperíodo e temperatura controladas (FUZITANI; NOMURA, 2004).

Ribas et al. (2003) comentam que a contaminação por micro-organismos é um problema na micropropagação, podendo ser limitante no estabelecimento de certos explantes *in vitro*.

A possibilidade da multiplicação massal para a clonagem de plantas em escala comercial é um dos benefícios da cultura de tecidos (RODRIGUES, 2008). Para a multiplicação *in vitro*, fitorreguladores, como BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético), têm sido utilizados com sucesso para diversas espécies (NOGUEIRA, 2003; SANTOS et al., 2006; BASTOS et al., 2007).

2.4.1 Meio de cultivo

O meio de cultivo é o composto que deve conter nutrientes necessários ao bom desenvolvimento dos explantes, sendo por vezes denominado meio nutritivo. No entanto, além de macro e micronutrientes, o meio de cultivo pode ser formado por uma série de

outros elementos que terão funções diversas relacionadas à adaptação do explante ao ambiente *in vitro*, bem como ao objetivo do método de cultura de tecidos empregado (QUISEN; ANGELO, 2008).

Apesar das diferenças entre os meios de cultivo utilizados na cultura de tecidos, alguns compostos podem ser frequentemente encontrados em sua preparação: água, micronutrientes, macronutrientes, fontes de carbono e energia, vitaminas, mio-inositol, aminoácidos, suplementos orgânicos, agentes solidificantes e fitorreguladores (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998; SAAD; ELSHAHED, 2012).

O MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é um meio de cultivo que surgiu a partir da otimização da concentração de macro e micronutrientes, sendo comumente empregado para diversas espécies cultivadas *in vitro*. Juntamente com o meio MS, o meio WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD; MCCOWN, 1980) é encontrado com frequência em trabalhos de cultivo *in vitro* com fruteiras do Cerrado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CARVALHO et al., 2011; PINHAL et al., 2011).

2.4.2 Fitorreguladores

Hormônios vegetais são pequenas moléculas naturais responsáveis por desencadear processos complexos no desenvolvimento de plantas. Tratam-se de compostos mensageiros que transmitem sinais a células que causam transformações no crescimento da planta e na formação de seus órgãos, bem como adaptações desses vegetais a condições ambientais. Substâncias semelhantes a esses hormônios podem ser obtidas artificialmente, gerando os fitorreguladores ou reguladores de crescimento que, quando aplicados, mesmo em pequenas quantidades, podem inibir, modificar ou estimular o desenvolvimento vegetal (CARVALHO et al., 2011).

Auxinas, ácido abscísico, citocininas, etileno e giberelinas são as principais classes de hormônios vegetais, sendo que para a cultura de tecidos vegetais a presença das citocininas e auxinas e sua interação são os estímulos mais comuns e necessários. Fitorreguladores utilizados no cultivo *in vitro* terão seu efeito dependente de vários fatores, desde o seu metabolismo na planta, tipo de explante, genótipo, condições culturais e até mesmo de sua interação entre os diferentes hormônios sintéticos e endógenos, sendo que qualquer grande incremento no desenvolvimento ou crescimento é dependente da influência mútua de diversos hormônios vegetais (GASPAR et al., 1996).

As auxinas, quando utilizadas em culturas *in vitro*, têm seu efeito observado na indução da friabilidade em calos, embriogênese, alongamento de entrenós, alongamento celular e enraizamento, enquanto as citocininas influenciam diretamente na divisão celular, podendo estimular a formação e desenvolvimento de gemas de brotação e na indução da parte aérea em calos e quebra de dominância apical. Nas fases de multiplicação *in vitro*, as citocininas são, geralmente, indispensáveis, mas a adição de alguma auxina pode ser necessária para que o processo aconteça, sendo que esse acréscimo de auxinas é comumente realizado em pequenas doses para que ocorra a promoção do crescimento sem a formação de calos. Existem, ainda, casos em que a presença de auxinas não é obrigatória para a realização da multiplicação *in vitro* (GEORGE et al., 2008; QUISEN; ANGELO, 2008).

Poliaminas são moléculas policatiônicas presentes em células de micro-organismos, animais e vegetais. Apesar de haver dúvida quanto à sua caracterização como hormônio vegetal, existem evidências de sua participação em diversos processos do desenvolvimento vegetal. Há indícios da conexão das poliaminas com: a transcrição de genes e replicação do DNA, divisão celular, metabolismo do nitrogênio, desenvolvimento de órgãos e frutos, senescência foliar, reação ao estresse abiótico e divisão celular. As poliaminas mais comumente encontradas nos vegetais são as esperminas, espermidinas e putrescinas (KAUR-SAWHNEY et al., 2003; QUISEN; ANGELO, 2008; MOSCHOU et al., 2012; RANGAN et al., 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. M. et al. State of the art of scientific literature on *Hancornia speciosa*: trends and gaps. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 38, n. 4, p. 869-879, 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v38n4/0100-2945-rbf-38-4-e-869.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2017
- ALMEIDA, S. P. **Cerrado**: aproveitamento alimentar. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa - CPAC, 1998.
- ALVES, R.T. Apresentação. In: SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru**: biologia e uso. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004 (Documentos, 116). p. 7-8.
- ALVES, A. M. et al. Oilseeds native to the Cerrado have fatty acid profile beneficial for cardiovascular health. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 29, n. 6, p.859-866, nov/dez. 2016.
- ANDRADE, A. C. S. et al. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 31, n. 1, p. 125-137, 2003.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.
- ARAÚJO, A.C.F. et al. Consumption of baru nuts (*Dipteryx alata*) in the treatment of obese mice. **Ciências Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 2, 2017.
- ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. A. Oligosaccharide profile in Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 76, p. 278-283, 2017.
- BASTOS, L. A.; FERREIRA, I. M. Composições fitofisionômicas do bioma cerrado: estudo sobre o subsistema de Vereda. **Espaço em Revista**, Catalão, v. 12, n 1, p. 97 – 108, jan/jun. 2010. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/espaco/article/view/17656>>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- BASTOS, L.P. et al. Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1122-1124, jul. 2007.
- BRASIL. Lei Federal n. 12.651 de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 102, Seção 1, p.1-8, 2012.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Mapeamento do uso e cobertura do Cerrado**: projeto terraclass Cerrado 2013. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2015.

- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. v. 1, p. 133-145.
- CAMARGO, M. P. et al. Cultura do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) na recuperação de áreas degradadas e como alternativa para a produção de biodiesel no Brasil. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. especial, p. 180-192, 2014. Disponível em: <<http://www.dca.uem.br/V3NE/14.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2017.
- CARRAZZA, L. R.; ÁVILA, J.C.C. **Aproveitamento integral do fruto do baru (*Dipteryx alata*)**. Brasília, DF: ISPN, 2010.
- CARVALHO, A. C. P. P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 30-60. 2011.
- CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campo Grande: Embrapa, 2003.
- CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de planta: o que é isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 19, p. 16-21. 2001. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio19/19_3.pdf>. Acesso em: 19 set. 2016.
- COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2006.
- DOUSSEAU, S. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n8/a8811cr4425.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2016.
- DUBOC, E. Sistemas agroflorestais e o Cerrado. In: FALEIRO, F.; FARIAS NETO, A.L de (Ed). **Savana: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 965-985.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Agropecuária. **A Embrapa nos biomas brasileiros**. 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82598/1/a-embrapa-nos-biomas-brasileiros.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2017.
- FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 15-19, 2004.
- GASPAR, T. et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 32, n. 4, p. 272-289, oct/dec. 1996.

GEORGE, E. F. et al. Plant Growth Regulators I: Introduction, Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. 2008. p. 175–204.

GONÇALVES, K. G.; DUARTE, G. S. D.; TSUKAMOTO FILHO, A. A. Espécies frutíferas do Cerrado e seu potencial para os SAFs. **FLOVET - Boletim do Grupo de Pesquisa da Flora, Vegetação e Etnobotânica**, Cuiabá, v. 1, n. 7, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Mapa de biomas do Brasil**: primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. 1 mapa, colorido. Escala 1:5.000.000.

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

KAUR-SAWHNEY, R. et al. Polyamines in plants: an overview. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Istambul, v. 2, p. 1-12, 2003.

KERR, W. E.; SILVA, F. R.; TCHUCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 169-171, abr. 2007.

LAMEIRA, O. A. et al. **Cultura de tecidos**: manual. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. v. 1 (Documentos, 66).

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

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

MARTINOTTO, C. et al. **Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)**. In: BRASIL. Ministério da Educação. Boletim Técnico - n.º 78. Lavras/MG. p. 1-21, 2008.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. Família Myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 317-346, 2014. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/Agrarian%20Academy/2014a/familia.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2016.

MOSCHOU, P. N. et al. The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 63, n. 14, p. 5003–5015, 2012.

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

NASCIMENTO, R. S. M.; CARDOSO, J. A.; COCOZZA, F. D. M. Caracterização física e físico-química de frutos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no oeste da Bahia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 8, p. 856–860, 2014.

NEPOMUCENO, D. L. M. G. **O extrativismo de baru (*Dipteryx alata* Vog) em Pirenópolis (GO) e sua sustentabilidade**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás, 2006.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 2003.

OLIVEIRA, D. L.; ROCHA, C. Alternativas sustentáveis para a merenda escolar com o uso de plantas do Cerrado, promovendo educação ambiental. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, Carreiros, v. 21, p. 35-53, jul/dez. 2008. Disponível em: <<https://www.seer.furg.br/remea/article/view/3035>>. Acesso em: 12 set. 2016.

OLIVEIRA, L. J. et al. Características agronômicas e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Campomanesia* sp. sob estresse hídrico. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 11, p. 43-53, 2011.

PIMENTA, A. C. et al. Caracterização de plantas e de frutos de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) nativos no cerrado mato grossense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 4, p. 892-899, dez. 2014.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p.1136-1142, jul. 2011.

PORTO, A. C.; GULIAS, A. P. S. M. Gabiroba. In: VIEIRA, R. F. et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 164-172.

QUISEN, R. C.; ÂNGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44 p.

RANGAN, P. et al. Recent advances in polyamine metabolism and abiotic stress tolerance. **BioMed Research International**, v. 2014, 9 p. 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/239621/>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, Exeter, n. 80, p. 223-230, 1997.

RIBAS, L. L. F. et al. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polineurom*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 115-122, jun. 2003.

RIBEIRO, J. F.; SILVA, J. C. S. Manutenção e recuperação da biodiversidade do bioma Cerrado: o uso de plantas nativas. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO: Biodiversidade e produção sustentável de alimentos e fibras nos Cerrados, 8., 1996, Planaltina. **Anais...** Planaltina: Embrapa-CPAC, 1996. p. 10-14.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofitofisionomia do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 89-166.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 253-260, set./dez. 2006.

RODRIGUES, M. R. L. Apresentação. In: QUISEN, R. C.; ÂNGELO, P. C. da S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

SAAD, A. I. M.; ELSHAHED, A. M. Plant Tissue Culture Media. In: LEVA, A.; RINALDI, L. M. R. **Recent Advances in Plant *in vitro* Culture**. InTech, 2012. p. 29-40. Disponível em: < <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media> > Acesso em: 5 ago. 2017.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. (Documentos, 116).

SANTOS, B. R. et al. Micropropagação de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 293-296, ago. 2006.

SILVA, E.P. et al. Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 803-809, out/dez. 2009.

SILVA, E. P.; VILAS BOAS, E. V. B.; XISTO, A. L. P. R. Characterization and development of marolo (*Annona crassiflora*, Mart.). **Food Science and Technology**, Campinas, v. 33, n. 4, p. 666-675, oct./dec. 2013.

SIQUEIRA, A. P. S. et al. Chemical quality of Baru almond (*Dipteryx alata* oil). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 10, p. 1865-1867, out. 2016.

SOARES, F. P. et al. Cultura da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). In: BRASIL. Ministério da Educação. **Boletim Técnico - n.º 67**. Lavras/MG. p. 1-12, 2006.

SOBRAL, M. et al. **Myrtaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10326>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

SUGUINO, E. et al. **Mirtáceas com frutos comestíveis do Estado de São Paulo: conhecendo algumas plantas**. Piracicaba: ESALQ, 2009. 46 p.

TAKEMOTO, E. et al. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 113-117, 2001.

VALLE, R. S. T. Aspectos da legislação voltados para adequação ambiental de imóveis rurais. In: GUERIN, N.; ISERNHAGEN, I (Org.). **Plantar, criar e conservar**: unindo produtividade e meio ambiente. São Paulo: Instituto Socioambiental, 2013.

VALLILO, M. I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.

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

VERA, R. et al. Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no Cerrado do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2009.

VILLARROEL, D. Aspectos generales y usos de la almendra Chiquitana. In: MOSTACEDO, B.; VILLARROEL, D. (Org.). **Identificación de variedades, ecología y productividad de la Almendra Chiquitana (*Dipteryx alata*)**. Santa Cruz de la Sierra: Dirección Universitaria de Investigación, 2015. p. 19-25.

WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma Cerrado**: síntese terminológica e relações florísticas. 389 f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília. 2006. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/3086>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

CAPÍTULO II

POLIAMINAS NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DA GABIROBEIRA (*Campomanesia* spp.)

RESUMO

As plantas nativas do Cerrado são importantes tanto no sentido da preservação, quanto do aproveitamento econômico. Espécies como a gabirobeira (*Campomanesia* spp.) são nativas que produzem frutos com boa receptividade e potencial comercial. A fim de estimular o aproveitamento da espécie, a cultura de tecidos vegetais pode fornecer subsídios para aprimorar seu cultivo e preservação. Visando a maximização do processo, foi testada a aplicação das poliaminas: espermina, espermidina e putrescina na multiplicação *in vitro* de gabirobeiras. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos – testemunha (ausência de fitorreguladores); espermina – 0,5 mg L⁻¹; espermina – 1,0 mg L⁻¹; espermidina – 0,5 mg L⁻¹; espermidina – 1,0 mg L⁻¹; putrescina – 0,5 mg L⁻¹ e putrescina 1,0 mg L⁻¹, três repetições e cinco plantas por unidade experimental. Os resultados mostram que as poliaminas não tiveram efeito no desenvolvimento e na multiplicação *in vitro* dos explantes de gabirobeira. No entanto, o bom desenvolvimento dos segmentos nodais subcultivados é promissor para novos trabalhos de multiplicação *in vitro* da espécie. É importante a realização de estudos com a utilização de poliaminas combinadas a outros fatores, como diferentes explantes e combinações de fitorreguladores no cultivo *in vitro* da gabirobeira, sobretudo visando o desenvolvimento da planta.

Palavras-chave: Espermina. Espermidina. Putrescina.

ABSTRACT

POLYAMINES ON *IN VITRO* MULTIPLICATION OF THE GABIROBEIRA (*Campomanesia* spp.)

The plants native to the Brazilian Cerrado are important for preservation as well as for economic reasons. Species like the gabirobeira (*Campomanesia* spp.) are natives that produce fruits that hold good receptivity and commercial potential. In order to stimulate a better use of the species, plant tissue culture can supply a base on which to improve their cultivation and preservation. Intending to maximize the process, the administration of the following polyamines was tested: spermine, spermidine, and putrescine on *in vitro* multiplication of gabirobeiras. The experiment was installed in a completely randomized design, with seven treatments - control (absence of growth regulators); spermine - 0.5 mg L⁻¹; spermine - 1.0 mg L⁻¹; spermidine 0.5 mg L⁻¹; spermidine - 1.0 mg L⁻¹; putrescine - 0.5 mg L⁻¹ and putrescine 1.0 mg L⁻¹, three replications, and five plants per experimental unit. Results show that polyamines effected neither the development nor the *in vitro* multiplication of explants of the gabirobeira. Nevertheless, the nodal segments subcultures progress is promising for new projects on *in vitro* multiplication of the species. It is important to implement studies using polyamines combined with other factors, like different explants and growth regulators combinations on *in vitro* cultivation of the gabirobeira, aiming for plant development above all else.

Keywords: Spermine. Spermidine. Putrescine.

1 INTRODUÇÃO

A importância do Cerrado para o Brasil é evidente tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. As regiões nas quais o bioma está presente abrigam parte considerável das áreas de produção agrícola. Ao mesmo tempo, sua grande biodiversidade e sua conexão com outros biomas faz com que a sua preservação seja necessária e que haja um equilíbrio entre a utilização agrícola e a manutenção das áreas naturais. Nesse sentido, um ponto de convergência dessas duas frentes é observado nas fruteiras nativas do Cerrado, já que diversas espécies se mostram promissoras para o comércio e também são peças chave na manutenção e recuperação de áreas naturais.

São interessantes a seleção e o estudo de espécies de fruteiras nativas de potencial, para que atendam a esse duplo propósito de preservação ecológica e aproveitamento econômico. Uma dessas fruteiras é a gabirobeira (*Campomanesia* spp.). Predominantemente, as espécies encontradas no Cerrado apresentam porte arbustivo e produzem pequenos frutos apreciados regionalmente que, além de consumidos *in natura*, podem ser processados a fim de produzir novos alimentos. O potencial comercial da espécie se dá, principalmente, pelo seu sabor, mas suas múltiplas possibilidades de uso, entre elas a recuperação de áreas, são um incremento no estímulo ao cultivo da gabirobeira. No entanto, são necessários estudos que gerem novas informações sobre o manejo, usos e importância da fruteira e assim proporcionem o impulso necessário ao cultivo da gabirobeira.

Um dos pontos primordiais ao manejo de uma planta está ligado às fases iniciais do seu desenvolvimento, portanto técnicas que possibilitem a produção de mudas e que, ao mesmo tempo, sejam acessíveis, são valiosas para fomentar a utilização da gabirobeira. Nesse sentido, a cultura de tecidos vegetais tem condições para fornecer essas mudas adequadas, uma vez que por meio dos métodos de cultivo *in vitro* é possível, em um curto período e com espaço e mão de obra reduzidos, produzir mudas selecionadas em larga escala, com qualidade, livres de contaminação e, além disso, economicamente viáveis.

Scutti (1999) testou diversas técnicas de cultura de tecidos para a gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*), trabalhando com explantes provenientes de cultivo *in vitro* e *ex vitro*. Seus resultados mostraram que a espécie se adapta à cultura de tecidos, mas que ainda há diversos pontos a serem elucidados.

Campos (2014) estudou a micropropagação da gabirobeira (*Campomanesia pubescens*) com o objetivo de conservação da espécie mediante o uso de técnicas complementares, como a criopreservação. A autora destaca a dificuldade encontrada para o enraizamento *in vitro* durante o processo, porém cita que as informações encontradas são satisfatórias para colaborar na preservação da planta, o que seria potencializado com a otimização do procedimento.

Maldonado (2014), por sua vez, estudou o estabelecimento *in vitro* de *Campomanesia* spp., encontrando resultados positivos no uso do hipoclorito de sódio para a desinfestação e do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de polivinilpirrolidona para o combate à oxidação *in vitro*.

A fase da multiplicação *in vitro* é a etapa que, muitas vezes, valida a cultura de tecidos, pois, com o aumento do número de mudas produzidas, o cultivo *in vitro* se torna vantajoso em comparação a um modelo eficiente de produção de mudas *ex vitro*. Para que a multiplicação aconteça com sucesso, os estímulos mais comuns vêm do uso de explantes responsivos com a aplicação de fitorreguladores.

Rossato (2015) pôde observar o efeito de diversos fitorreguladores para a multiplicação, enraizamento e produção de calos de *Campomanesia adamantium*.

As poliaminas são compostos envolvidos em diversas reações do metabolismo vegetal. Ainda que sua influência e suas rotas metabólicas não estejam elucidados, espera-se que o seu uso estimule o desenvolvimento das plantas. Por isso, tais compostos são utilizados na cultura de tecidos, principalmente espermidina, espermina e putrescina. Walden, Cordeiro e Tiburcio (1997) discutem a participação das poliaminas em diversos momentos do desenvolvimento vegetal, destacando que ainda há muito a ser elucidado em relação à sua ação nos organismos vegetais.

Assim, este trabalho objetivou testar os efeitos das poliaminas: espermidina, espermina e putrescina na multiplicação e desenvolvimento *in vitro* da gabirobeira e, como complemento, entender o efeito dessa classe de fitorreguladores em uma espécie que não teve o seu genoma selecionado por técnicas de melhoramento. E desse modo, contribuir na construção de informações que possam ajudar a elucidar a função dessas moléculas no metabolismo vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizado em Uberlândia – MG.

Para a inoculação, foram utilizados explantes extraídos de plantas de gabirobeira previamente estabelecidas a partir de germinação *in vitro*. Os explantes utilizados foram segmentos nodais com cerca de dois centímetros de comprimento, sem folhas, retirados em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas.

Após a retirada, os explantes foram imediatamente colocados em frascos de vidro com capacidade de 150 mL e vedados com tampa plástica. Cada frasco continha 40 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 0,4 mg L⁻¹ de tiamina; 1 mg L⁻¹ de piridoxina; 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol; 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada; 7 g L⁻¹ de ágar; 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. O meio de cultivo nos frascos continha fitorreguladores conforme os tratamentos testados. Antes da inoculação, os frascos com os meios foram autoclavados durante 20 minutos a uma temperatura de 121° C, após esse período os meios foram deixados em repouso para esfriarem e serem destinados à inoculação posteriormente.

Os tratamentos foram constituídos de diferentes poliaminas adicionadas aos meios de cultivo: espermina, espermidina e putrescina, todas utilizadas em duas concentrações (0,5 e 1,0 mg L⁻¹). Além disso, um dos tratamentos não continha fitorreguladores, constituindo a testemunha.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos (testemunha; espermina – 0,5 mg L⁻¹; espermina – 1,0 mg L⁻¹; espermidina – 0,5 mg L⁻¹; espermidina – 1,0 mg L⁻¹; putrescina – 0,5 mg L⁻¹ e putrescina 1,0 mg L⁻¹) e três repetições, totalizando 21 unidades experimentais, sendo cada uma composta por cinco frascos, contendo um explante cada.

Os frascos foram acomodados em sala de crescimento, mantidos à temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas de luz, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias, que proporcionavam uma intensidade luminosa de 25 µmol m⁻² s⁻¹.

Decorridos 90 dias, as plantas foram avaliadas quanto às seguintes características: comprimento da parte aérea (cm), medido desde a base até a região do ápice caulinar;

número de folhas; teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), contabilizado com a utilização do aparelho SPAD 502 Minolta, selecionando para o procedimento a folha mais próxima da região apical, expandida e sem sinais de amarelecimento; massa fresca (mg) e massa seca (mg), observadas com a utilização de uma balança de precisão, sendo que, para a obtenção da massa seca, as plantas foram deixadas em sacos de papel e levadas a estufa de circulação forçada com temperatura de 60 a 65°C até que atingissem massa constante. Com a coleta de dados foi possível estimar o teor de água nas plantas (%), calculado pela diferença de massa seca e massa fresca, com valores convertidos para taxas percentuais.

Os dados tabulados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, com os testes de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,01$) e Levene ($\alpha = 0,01$), respectivamente, através do programa SPSS. Após as pressuposições serem atendidas, foi realizada a análise de variância ($\alpha = 0,01$), com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos para nenhuma das variáveis testadas (TABELA 1).

TABELA 1. Resumo da análise de variância para o comprimento (cm), número de folhas, teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), massa seca (mg), massa fresca (mg) e teor de água de explantes (%) de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) em meios de cultivo com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

| Fontes de Variação | GL | Quadrados Médios | | | | | |
|--------------------|----|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| | | Comprimento | Folhas | Teor de clorofila | Massa fresca | Massa seca | Teor de água |
| Tratamentos | 6 | 0,05 ^{ns} | 1,38 ^{ns} | 1,46 ^{ns} | 1688,16 ^{ns} | 159,07 ^{ns} | 21,47 ^{ns} |
| Resíduo | 20 | 0,22 | 1,59 | 4,71 | 740,54 | 63,53 | 35,00 |
| CV (%) | | 18,05 | 16,54 | 9,13 | 28,01 | 22,92 | 9,36 |

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Aspectos relacionados ao enraizamento *in vitro* não puderam ser avaliados devido ao número ínfimo de plantas que produziram raízes. A dificuldade na rizogênese de *Campomanesia* spp. *in vitro* é conhecida e trabalhos utilizando citocininas e auxinas já foram conduzidos visando a solução do problema, porém sem sucesso (ROSSATO et al., 2015; SCUTTI, 1999).

Os trabalhos realizados por Campos (2014) com *Campomanesia pubescens* e Rossato et al. (2015) com *Campomanesia adamantium* demonstram a dificuldade em potencializar a multiplicação da gabirobeira *in vitro*. Em ambos os casos, os autores buscaram a multiplicação *in vitro* a partir da aplicação de BAP no meio de cultivo. Enquanto Rossato et al. (2015) não observaram diferenças no número de brotos a partir da utilização de BAP em doses de 0,25 até 2 mg L⁻¹, Campos (2014) obteve maiores taxas de brotação utilizando dose próxima a 1,0 mg L⁻¹ do fitorregulador, ainda assim nos dois trabalhos o número de brotações pode ser considerado insuficiente, uma vez que foram geradas menos do que duas brotações por explante.

O uso das poliaminas nas doses testadas também não parece estimular a brotação dos explantes, já que não foram observadas modificações relevantes nesse sentido. Desse modo, nota-se que a espécie se mostra pouco responsiva a essa transformação. Dada a importância da etapa de multiplicação para a produção em larga escala de mudas de

gabirobeira, é essencial que sejam realizados novos experimentos testando outros reguladores de crescimento, em diferentes combinações ou até novas doses das poliaminas.

Uma alternativa é direcionar esforços para técnicas como a embriogênese somática, que traz a possibilidade da produção de um grande número de novos explantes a partir de pequenos segmentos vegetais. Nesse sentido, Debiasi, Fráguas e Lima (2007) testaram poliaminas no cultivo *in vitro* de calos de *Hemerocallis* sp.. Os autores mostram o efeito positivo da putrescina isolada para o estímulo da formação e crescimento de brotos e também da putrescina em combinação com outras poliaminas para o crescimento das brotações. No entanto, para nenhuma dessas características, as poliaminas tiveram papel superior ao do tratamento controle, o que mostra que esses compostos têm a capacidade de estimular as plantas *in vitro*, mas que o controle desse estímulo é complexo.

Além do estímulo à brotação, características interessantes a serem avaliadas são aquelas relacionadas ao desenvolvimento do explante, pois apesar da gabirobeira apresentar dificuldade na sua multiplicação (ROSSATO et al., 2015; SCUTTI, 1999), observa-se uma propensão para a formação de novas plantas a partir de segmentos nodais, já que, dos 105 explantes utilizados no experimento, 95 geraram novas plantas estabelecidas *in vitro*. Assim, com o estímulo do crescimento caulinar, haveria a possibilidade de retirar quantidades consideráveis de explantes, o que seria maximizado com subcultivos, reduzindo a necessidade de multibrotações.

Devido a esse fato, foram avaliadas características de desenvolvimento nas plantas de gabirobeira (FIGURAS 1 e 2). Não foram constatadas diferenças significativas entre os fatores avaliados, em especial, o comprimento, número de folhas e teor de clorofila parecem sofrer pouca influência da ação das poliaminas, uma vez que, para tais atributos, houve pouca variação em relação à testemunha, o que vai ao encontro do trabalho de Debiasi, Fráguas e Lima (2007), no qual a altura de *Hemerocallis* sp. não foi maior nos explantes tratados com poliaminas.

Observa-se que os elementos relacionados à massa da planta (massa fresca, massa seca e teor de água) foram mais influenciados pelas poliaminas, já que, para alguns tratamentos, como espermina ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), espermidina ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e putrescina ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) os valores observados foram consideravelmente superiores à testemunha (FIGURA 2). Os resultados podem auxiliar no direcionamento de experimentos futuros, visto que estes fitorreguladores, para a espécie em questão, parecem não causar uma transformação específica, atuando na multiplicação ou enraizamento, mas há indícios de que elas agiriam

no desenvolvimento geral do explante. Assim, trabalhos que potencializem a ação das poliaminas podem resultar em efeitos significativos para características de desenvolvimento do explante como massa fresca, massa fresca e teor de água.

Acosta et al. (2012), constataram a correlação entre as poliaminas e o desenvolvimento vegetal *in vitro* de *Annona muricata*, considerando essas moléculas para a indicação fisiológica de organogênese, divisão e alongamento celular. Mógor, Lima e Mógor (2007) mostram o efeito de esperminas e espermidinas no incremento da massa seca de plantas de *Aloe vera* cultivadas *in vitro*.

O crescimento de explantes de gabirobeira se mostra um processo repleto de relações intrincadas. No trabalho de Rossato et al. (2015), maiores comprimentos de brotação foram obtidos na ausência de luz, sendo esse crescimento dependente da aplicação de BAP no meio de cultivo. Essa informação é um estímulo para conjecturar que a possibilidade de combinação de poliaminas com outros reguladores de crescimento, sistemas de cultivo e regimes de luminosidade pode impactar o desenvolvimento das gabirobeiras *in vitro*.

Kaur-Sawhney et al. (2003) mostram evidências da participação de poliaminas em diversos processos do desenvolvimento vegetal, relatando a necessidade de esclarecimentos a respeito do metabolismo desses compostos e sua atuação nas plantas.

Observa-se que, nos moldes deste experimento, espermina, espermidina e putrescina não foram efetivos para o aprimoramento do cultivo *in vitro* da gabirobeira. Estudos futuros com a utilização de poliaminas devem ser realizados, testando a interação com outras variáveis. É provável que resultados mais interessantes sejam atingidos com o direcionamento dessas pesquisas para o crescimento das plantas e não para sua multiplicação ou enraizamento.

As transformações obtidas no cultivo *in vitro* são oriundas de complexas interações entre espécie, explante utilizado, meio de cultivo, fitorreguladores e suas doses, de modo que as reações obtidas a partir de novas combinações de reguladores de crescimento e explantes são de difícil previsão. Quando se trabalha com espécies como a gabirobeira, sobre a qual há poucas pesquisas e estudos a respeito de sua micropropagação, a seleção de compostos que colaborem no seu desenvolvimento pode ser lenta e repleta de etapas. A divulgação de resultados que abordem esse tema é essencial para o sucesso de trabalhos futuros.

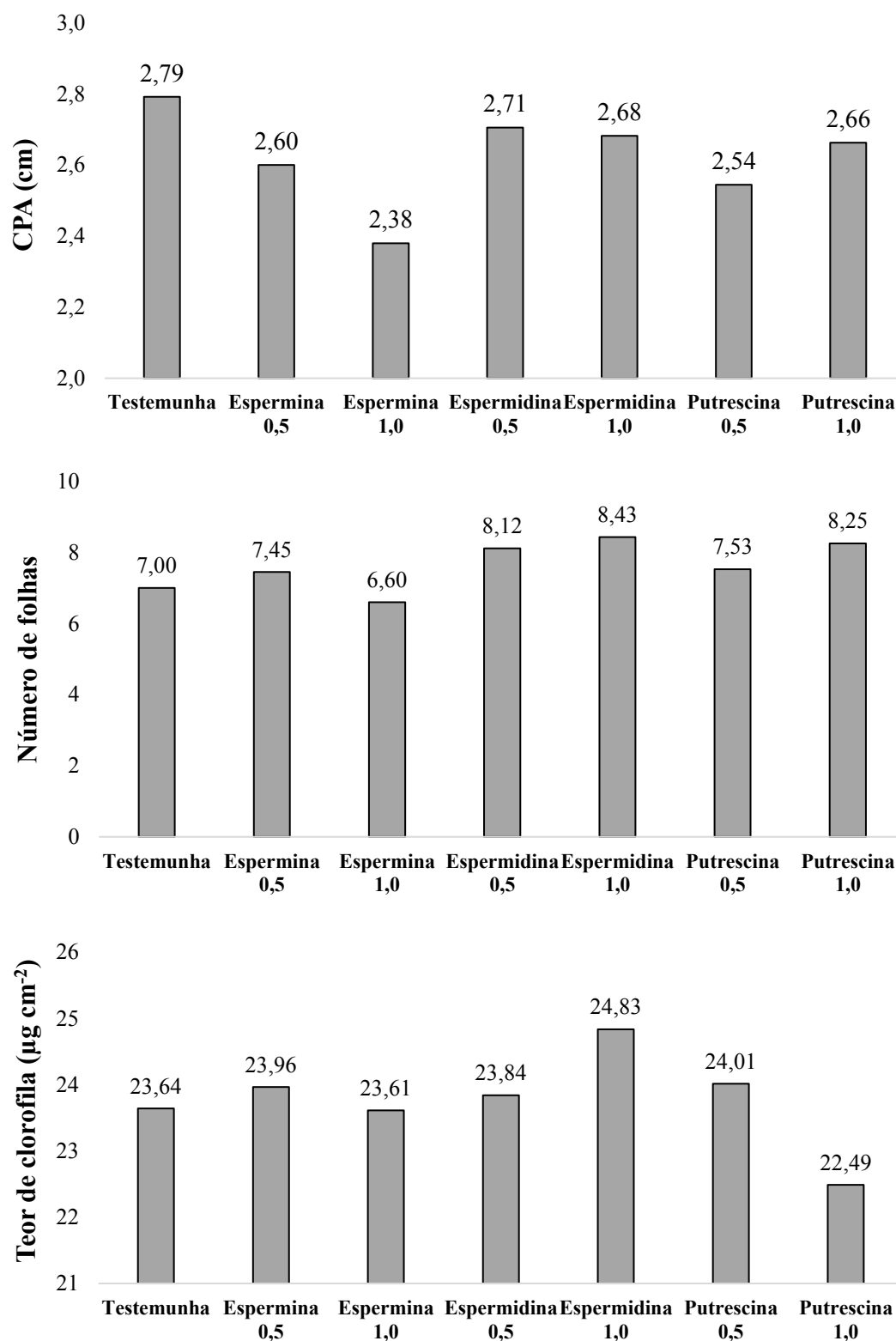


FIGURA 1. Comprimento da parte aérea - CPA (cm), número de folhas e teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$) em explantes de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) cultivados em meios contendo doses variadas de diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

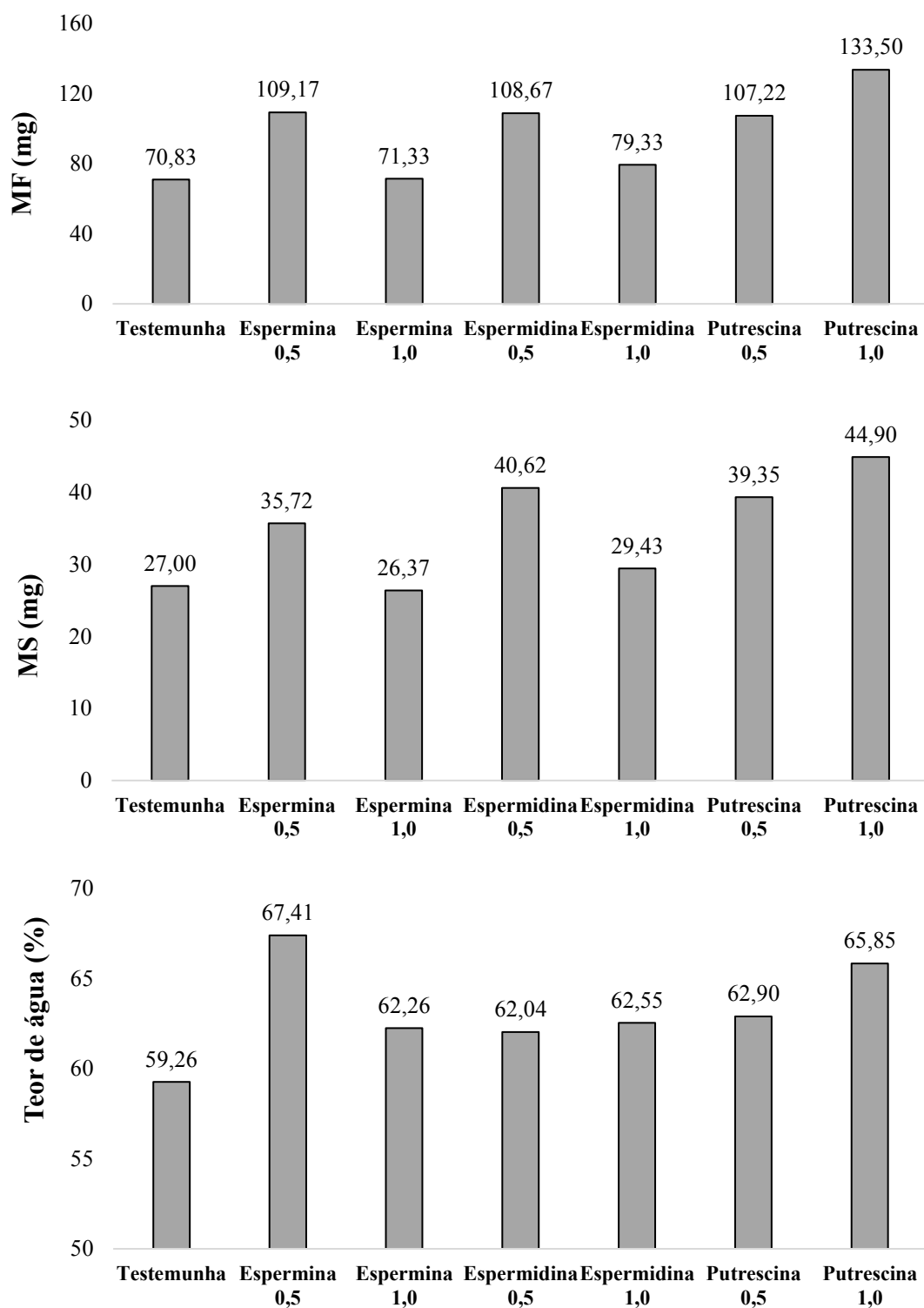


FIGURA 2. Massa fresca – MF (mg), massa seca – MS (mg) e teor de água (%) em explantes de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) cultivados em meios contendo doses variadas de diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

4 CONCLUSÕES

Espermina, espermidina e putrescina não foram eficazes na multiplicação *in vitro* da gabirobeira.

A espécie apresenta capacidade satisfatória de propagação a partir de segmentos nodais. O aprimoramento dessa técnica pode auxiliar na multiplicação *in vitro* da fruteira.

5 CONSIDERAÇÃO FINAL

É importante a realização de estudos futuros com a utilização de poliaminas combinadas com outras técnicas, explantes, níveis de luminosidade, fitorreguladores e doses dos mesmos no cultivo *in vitro* da gabirobeira, sobretudo visando o estímulo ao desenvolvimento da planta *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA R. A. M. et al. Correlación de la concentración de poliaminas con el desarrollo “*in vitro*” de *Annona muricata* L. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, Popayán, v. 10, n. 2, p. 71 – 78, jul./dec. 2012.

CAMPOS, N. A. **Estratégias para conservação *in vitro* de gabirobeira (*Campomanesia pubescens*): micropropagação, unidade encapsuláveis e criopreservação**. 110 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/4465>>. Acesso em: 13 set. 2016.

DEBIASI, C.; FRÁGUAS, C. B.; LIMA, G. P. P. Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p.1014-1020, jul./ago. 2007.

FERREIRA, D. F. **SISVAR: sistemas de análises de variância**. Lavras: UFLA, 2006. (Software estatístico).

KAUR-SAWHNEY, R. et al. Polyamines in plants: An overview. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Istambul, v. 2, p. 1-12, 2003.

MALDONADO, A. C. B. **Propagação *in vitro* da gabirobeira (*Campomanesia* spp.)**. 114 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2014.

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

MÓGOR, G.; LIMA, G. P. P.; MÓGOR, A. F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 37-47, 2007.

ROSSATO, M. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos e ultraestruturais da calogênese em *Campomanesia adamantium***. 64 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Goiás, 2015.

ROSSATO, M. et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de gabirobeira. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 70-77, 2015.

SCUTTI, M. B. **Propagação vegetativa da guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) *in vitro* e por estaquia**. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 1999.

WALDEN, R.; CORDEIRO, A.; TIBURCIO, A.F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 113, p. 1009-1013, 1997.

CAPÍTULO III

FITORREGULADORES NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DO BARUZEIRO (*Dipteryx alata* Vog.)

RESUMO

O baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) é uma fruteira nativa do Cerrado de grande potencial graças ao consumo de sua amêndoa e suas múltiplas possibilidades de uso. As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem colaborar tanto no estímulo ao seu cultivo quanto na sua preservação. Os fitorreguladores são as ferramentas mais comumente utilizadas para estimular a multiplicação *in vitro*. Assim, este trabalho teve como objetivo testar fitorreguladores no cultivo *in vitro* do baruzeiro. Foram realizados quatro experimentos. No Experimento 1, foram testados sete fitorreguladores (espermina, espermidina, putrescina, 2iP, cinetina, zeatina e BAP) no estabelecimento *in vitro* a partir de sementes. O experimento foi instalado em DIC com sete tratamentos e três repetições. A zeatina foi o fitorregulador que proporcionou a formação do maior número de brotações. O Experimento 2 também utilizou sementes como explantes e foi instalado em DIC com oito tratamentos e três repetições, em esquema fatorial 4x2 com quatro doses de BAP (3, 6, 9 e 12 mg L⁻¹) na presença e ausência de ANA (0,5 mg L⁻¹). A variação nas doses de BAP e a presença de ANA não foram efetivas para a multiplicação do baruzeiro. No Experimento 3, os fitorreguladores espermina, espermidina, putrescina, 2iP, cinetina, zeatina e BAP foram testados no cultivo de segmentos nodais de baruzeiro, extraídos de plantas previamente cultivadas *in vitro*. O experimento foi instalado em DIC, com sete tratamentos e três repetições. A espermina foi o regulador vegetal que proporcionou a maior taxa de brotação por explante. As citocininas tiveram desempenho semelhante entre si. No Experimento 4, por sua vez, doses de BAP (3, 6, 9 e 12 mg L⁻¹) em combinação com ANA (0,25 e 0,5 mg L⁻¹) foram testadas na multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais de plantas estabelecidas *in vitro*. O trabalho foi realizado em esquema fatorial 4x2 (BAP x ANA), com delineamento inteiramente casualizado, oito tratamentos e três repetições. A multiplicação *in vitro* do baruzeiro em concentrações de BAP superiores a 6 mg L⁻¹ foi favorecida pela combinação com 0,5 mg L⁻¹ de ANA. A combinação de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 12 mg L⁻¹ de BAP mostrou-se mais promissora para gerar brotações em segmentos nodais de baruzeiro. Conclui-se que a multiplicação *in vitro* do baruzeiro mediante o estímulo de fitorreguladores é possível. As informações obtidas nesse estudo são de grande relevância na produção de um protocolo completo para o cultivo *in vitro* do baruzeiro.

Palavras-chave: Poliaminas. Citocininas. ANA.

ABSTRACT

GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* MULTIPLICATION OF THE BARUZEIRO (*Dipteryx alata* Vog.)

The baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) is a native Brazilian Cerrado fruit tree with great potential due to the consumption of its almonds and its multiple possibilities of usage. The techniques of plant tissue culture can contribute to both the stimulation of its cultivation and its preservation. Growth regulators are the most commonly tools used to stimulate *in vitro* multiplication. Thereby, this work focused on testing growth regulators on *in vitro* cultivation of the baruzeiro. Four experiments were performed. In Experiment 1, seven growth regulators (spermine, spermidine, putrescine, 2iP, kinetin, zeatin and BAP) were tested on *in vitro* establishment with seeds. The experiment was installed in a CRD with seven treatments and three replications. Zeatin was the growth regulator that provided the greatest number of shoots. In Experiment 2, seeds were also used as explants and they were installed in CRD with eight treatments and three replications, in a 4x2 factorial design, with four doses of BAP (3, 6, 9 and 12 mg L⁻¹) in the presence and absence of NAA (0.5 mg L⁻¹). Variations in the doses of BAP and the presence of NAA were not effective for the multiplication of the baruzeiro. In Experiment 3, spermine, spermidine, putrescine, 2iP, kinetin, zeatin and BAP were tested in the cultivation of nodal segments from the baruzeiro, extracted from plants previously cultivated *in vitro*. The experiment was installed in a CRD, with seven treatments and three replications. Spermine was the growth regulator that provided the highest rate of shoots per explant. Cytokinins all performed similarly amongst themselves. In Experiment 4, on the other hand, doses of BAP (3, 6, 9 and 12 mg L⁻¹) combined with NAA (0.25 and 0.5 mg L⁻¹) were tested in *in vitro* multiplication from the nodal segments from plants established *in vitro*. The experiment was performed in a 4x2 factorial structure with completely randomized design, eight treatments and three replications. The *in vitro* multiplication of the baruzeiro in concentrations of BAP greater than 6 mg L⁻¹ benefited from being combined to 0.5 mg L⁻¹ of NAA. The combination of 0.5 mg L⁻¹ of NAA and 12 mg L⁻¹ of BAP showed itself to be very promising for the shoot induction in nodal segments from the baruzeiro. In conclusion, it is possible to perform *in vitro* multiplication of the baruzeiro through the stimulus of growth regulators. The information obtained in this study has great relevance to the production of an entire protocol for the *in vitro* cultivation of the baruzeiro.

Keywords: Polyamines. Cytokinins. NAA.

1 INTRODUÇÃO

O baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) é uma fruteira nativa do Cerrado apreciada devido ao consumo de sua amêndoa. Além disso, é uma planta com possibilidade de uso madeireiro, medicinal, forrageiro e na recuperação de áreas degradadas (ALVES, 2004; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004). Com a crescente necessidade de preservação aliada ao melhor aproveitamento econômico de áreas rurais, a utilização da espécie merece incentivo.

A cultura de tecidos vegetais pode contribuir de maneira satisfatória para o desenvolvimento da espécie, tanto no estímulo ao seu cultivo, com tecnologias para a produção de mudas de elevada qualidade fitossanitária com custos reduzidos, quanto para a sua preservação a partir da conservação *in vitro*. Graças a tais possibilidades, trabalhos têm sido desenvolvidos objetivando a elaboração de protocolos para o cultivo *in vitro* do baruzeiro (PINHAL, 2012; ARARUNA, 2015; GAMBATTI et al., 2015; SILVA et al., 2016a).

Silva et al. (2016b) realizaram trabalhos para definir a adaptação do baruzeiro a diferentes meios de cultivo e a doses de carvão ativado. Os resultados apresentados demonstram sucesso na resposta da espécie às técnicas de cultura de tecidos, especialmente utilizando sementes como explantes.

Para que o protocolo de cultivo *in vitro* do baruzeiro seja potencializado são necessários estudos relacionados a etapas que vão além do estabelecimento. Nesse contexto, Araruna (2015) realizou trabalhos visando à definição dos melhores meios de cultivo e fitorreguladores para o cultivo de ápices caulinares provenientes de plantas já estabelecidas *in vitro*. Os resultados apresentados mostram que o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) pleno é o mais adequado para o desenvolvimento de ápices caulinares e a dose de 4 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) foi a melhor para a formação de brotos. No entanto, a própria autora ressalta a necessidade de pesquisas com doses superiores da citocinina, visto que o número de brotações encontrado é pequeno para a produção massal de mudas. Além disso, apesar do ápice caulinar ser um explante, aparentemente, mais responsivo aos estímulos dos fitorreguladores, seria interessante o uso de outros, como os segmentos nodais, uma vez que, utilizando estes, se extrairiam diversos explantes a partir de uma única germinação *in vitro*, o que intensificaria o processo.

Trabalhando com a germinação *in vitro* do baruzeiro foi possível observar que, em alguns casos, sem a necessidade de estímulos específicos, a semente é capaz de emitir mais de uma brotação, sendo que estas surgem posteriormente, com o desenvolvimento do caule principal. Porém, essa transformação acontece com pouca frequência e sem que haja o controle de sua ocorrência. Caso seja possível estimular o seu surgimento, o processo de multiplicação se iniciaria junto com o estabelecimento, trazendo enormes benefícios com a redução de uma das etapas do cultivo *in vitro*.

Para estimular a multiplicação e o crescimento do material vegetal na cultura de tecidos, as ferramentas mais comuns são os fitorreguladores, sendo as citocininas, juntamente com pequenas doses de auxinas, aqueles mais frequentemente encontrados nos ensaios realizados. Outra possibilidade é a adição de poliaminas ao meio e, uma vez que esses reguladores de crescimento ainda têm seu efeito pouco definido para muitas espécies, sua aplicação poderia provocar modificações ainda não observadas no desenvolvimento do baruzeiro.

Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos de citocininas, auxinas e poliaminas na multiplicação *in vitro* a partir de sementes e segmentos nodais de baruzeiros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizado em Uberlândia – MG.

Foram realizados quatro experimentos testando diferentes fitorreguladores.

2.1 Experimento 1

Foram testados os efeitos de sete fitorreguladores no estabelecimento *in vitro* do baruzeiro a partir de sementes: benzilaminopurina (BAP) – 3,0 mg L⁻¹; cinetina (KIN) – 3,0 mg L⁻¹; isopenteniladenina (2iP) – 3,0 mg L⁻¹; zeatina – 3,0 mg L⁻¹; putrescina – 1,0 mg L⁻¹; espermina – 2,0 mg L⁻¹ e espermidina – 2,0 mg L⁻¹.

Os fitorreguladores foram adicionados a um meio de cultivo contendo apenas água, 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado e 7 g L⁻¹ de ágar. Foram adicionados 40 mL de meio de cultivo por frasco, sendo que cada frasco tinha capacidade de 150 mL. Após isso, eles foram vedados com tampa plástica e levados para autoclavagem durante 20 minutos à temperatura de 121° C. No dia seguinte, foi realizada a inoculação das sementes.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e três repetições, totalizando 21 unidades experimentais, sendo cada uma delas composta por quatro frascos, contendo dois explantes cada, correspondendo a 168 explantes no experimento.

Os frutos utilizados foram coletados em Conceição das Alagoas – MG, retirados da mesma árvore. Foram recolhidos após caírem ao chão, quando estavam no seu estágio de maturação completa. As sementes foram retiradas com o auxílio de uma máquina de propulsão mecânica para corte de frutos de baruzeiro. Foram selecionadas apenas aquelas que estavam em perfeito estado de sanidade e sem danos mecânicos.

As sementes foram direcionadas ao Laboratório de Biotecnologia onde foram lavadas em água corrente com aplicação de detergente líquido neutro durante 10 minutos. Após esse procedimento, foram levadas até a câmara de fluxo laminar sob condições assépticas e passaram pelo processo de assepsia, que foi constituído pela imersão em álcool 70% (v v⁻¹) durante um minuto e meio, seguido da imersão em hipoclorito de sódio

2% (v v⁻¹) por 30 minutos, sendo depois foram submetidas a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada.

As sementes foram inoculadas em seus respectivos meios e levadas à sala de crescimento, onde permaneceram durante 100 dias, sob temperatura controlada de 25°C ±1 e submetidas a 16 horas de luz com intensidade luminosa de 25 µmol m⁻² s⁻¹.

Passado esse período, foram realizadas as avaliações para as seguintes características: comprimento da parte aérea – CPA (cm) e da raiz das plantas – CR (cm); teor de clorofila; número de folhas por explante; número de brotações basais, brotações superiores e brotações totais por explante; massa fresca da parte aérea – MFPA (g); massa seca da parte aérea – MSPA (g); massa fresca das raízes – MFR (g); massa seca das raízes – MSR (g) e teor de água das plantas (%).

O comprimento da parte aérea foi mensurado da base da planta até o ápice caulinar, enquanto o comprimento da raiz levou em conta apenas a raiz principal. O teor de clorofila foi contabilizado com a utilização do aparelho SPAD 502 Minolta, selecionando para o procedimento o folíolo mais próximo à região apical da planta que estivesse completamente expandido e não apresentasse sinais de amarelecimento. Para o número de folhas, foram consideradas aquelas com, no mínimo, seis folíolos completamente expandidos. As brotações basais (FIGURA 1a) eram aquelas localizadas próximas à junção do cotilédone com a planta (FIGURA 1d), enquanto as brotações superiores (FIGURA 1b) estariam em qualquer região acima desse ponto, porém deveriam ter o aspecto de mini plantas, com a formação de folhas já iniciada. As brotações totais foram obtidas da soma das brotações basais e superiores. A massa fresca foi observada com o auxílio de uma balança de precisão após a retirada das plantas do meio de cultivo e separação das raízes e parte aérea, em seguida, os segmentos vegetais foram acondicionados em sacos de papel e levadas à estufa de circulação forçada com temperatura de 60 a 65°C até que atingissem massa constante e a massa seca de raízes e da parte aérea fosse contabilizada. O teor de água das plantas foi obtido pela diferença percentual entre a massa seca e fresca das plantas.

2.2 Experimento 2

Neste trabalho, foram testados os fitorreguladores benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) na germinação *in vitro* do baruzeiro. Foram avaliados os efeitos da presença e a ausência de ANA (0,5 mg L⁻¹) no meio de cultivo em combinação

com BAP nas doses de 3,0; 6,0; 9,0 e 12 mg L⁻¹. O experimento foi instalado em esquema fatorial 4x2 (doses de BAP x presença e ausência de ANA) com delineamento inteiramente casualizado, constituído de oito tratamentos e três repetições, totalizando 24 parcelas, sendo cada unidade experimental constituída de três frascos com dois explantes cada, gerando um total de 144 explantes no experimento.

As sementes utilizadas, o sistema de assepsia, inoculação, os locais e procedimentos para montagem, a duração do ensaio e as avaliações realizadas foram idênticos àqueles do Experimento 1. As únicas diferenças foram os frascos utilizados, que possuíam capacidade para 250 mL e continham 60 mL de meio de cultivo. Além disso, em virtude dos resultados de massa observados, não foi realizada a avaliação do teor de água das plantas.

2.3 Experimento 3

O trabalho teve como explantes segmentos nodais obtidos de plantas de baruzeiro previamente estabelecidas *in vitro* e isentas de contaminação. Os ápices caulinares das plantas foram descartados e os segmentos foram retirados da porção restante do caule. Os explantes foram segmentados para que tivessem aproximadamente dois centímetros, desde que fosse garantida a presença de ao menos duas gemas de brotação por explante. Eles foram excisados em câmara de fluxo laminar sob condições assépticas e, em seguida, inoculados em posição vertical em frascos com capacidade de 150 mL, contendo 40 mL dos meios de cultivo com diferentes reguladores de crescimento.

Os fitorreguladores testados foram: BAP – 3,0 mg L⁻¹; KIN – 3,0 mg L⁻¹; 2iP – 3,0 mg L⁻¹; zeatina 3,0 – mg L⁻¹; putrescina – 1,0 mg L⁻¹; espermina – 2,0 mg L⁻¹ e espermidina – 2,0 mg L⁻¹.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos, três repetições e quatro frascos com explante único por parcela, totalizando 21 unidades experimentais e 84 explantes.

O meio de cultivo utilizado foi MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 0,4 mg L⁻¹ de tiamina; 1 mg L⁻¹ de piridoxina; 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol; 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada; 7 g L⁻¹ de ágar; 30 g L⁻¹ de sacarose; 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado e pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

Os frascos foram levados à sala de crescimento onde permaneceram por 120 dias sob luminosidade e temperatura controladas com 16 horas de luz diárias, intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Após esse período, os explantes foram avaliados quanto às características: comprimento das brotações – CB (cm); número de ramos e de folhas por brotação; teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$); número de brotações pequenas - BP, brotações grandes - BG e brotações totais - BT por explante; massa fresca e seca das brotações - MFB e MSB (g).

As brotações foram classificadas em brotações pequenas ou grandes de acordo com o seu grau de desenvolvimento. As brotações pequenas (FIGURA 1e) eram aquelas que iniciaram o seu desenvolvimento, mas não apresentavam estruturas vegetais, como ramos e folhas, já diferenciadas. As brotações grandes (FIGURA 1c) já possuíam maior comprimento e deveriam ter começado a diferenciação de suas estruturas vegetais. As brotações que tiveram suas características avaliadas foram brotações grandes com, no mínimo, 0,5 cm de comprimento e com ao menos um folíolo já formado e expandido.

O comprimento das brotações foi medido da base até o ápice caulinar. O número de ramos foi avaliado considerando-se todas as ramificações originadas do caule principal, desde pecíolos foliares até primórdios de galhos e folhas. As folhas levadas à avaliação continham, no mínimo, seis folíolos completamente expandidos. O teor de clorofila foi mensurado em folíolos próximos a região apical das brotações que não apresentavam sinais de amarelecimento e estavam completamente expandidos, tal procedimento foi realizado com a utilização do aparelho SPAD 502 Minolta. A massa das brotações foi obtida com o uso de uma balança de precisão. As brotações foram acondicionadas em placas de Petri cobertas com papel toalha e deixadas em estufa de circulação forçada com temperatura de 60 a 65°C até que se atingisse massa constante para a obtenção da massa seca das brotações.

2.4 Experimento 4

Os métodos aplicados, explantes utilizados e sistemas de avaliação foram os mesmos do Experimento 3, com diferenças em relação aos tratamentos.

Foram testadas doses de BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de baruzeiro. Com ANA nas doses de 0,25 e 0,50 mg L^{-1} de meio de cultivo e BAP nas doses de 3,0; 6,0; 9,0 e 12 mg L^{-1} , resultando em um experimento em esquema fatorial 4x2 (BAP x ANA) com delineamento inteiramente casualizado, constituído de oito

tratamentos e três repetições, com quatro frascos de explante único por unidade experimental, totalizando 24 parcelas e 96 explantes no experimento.

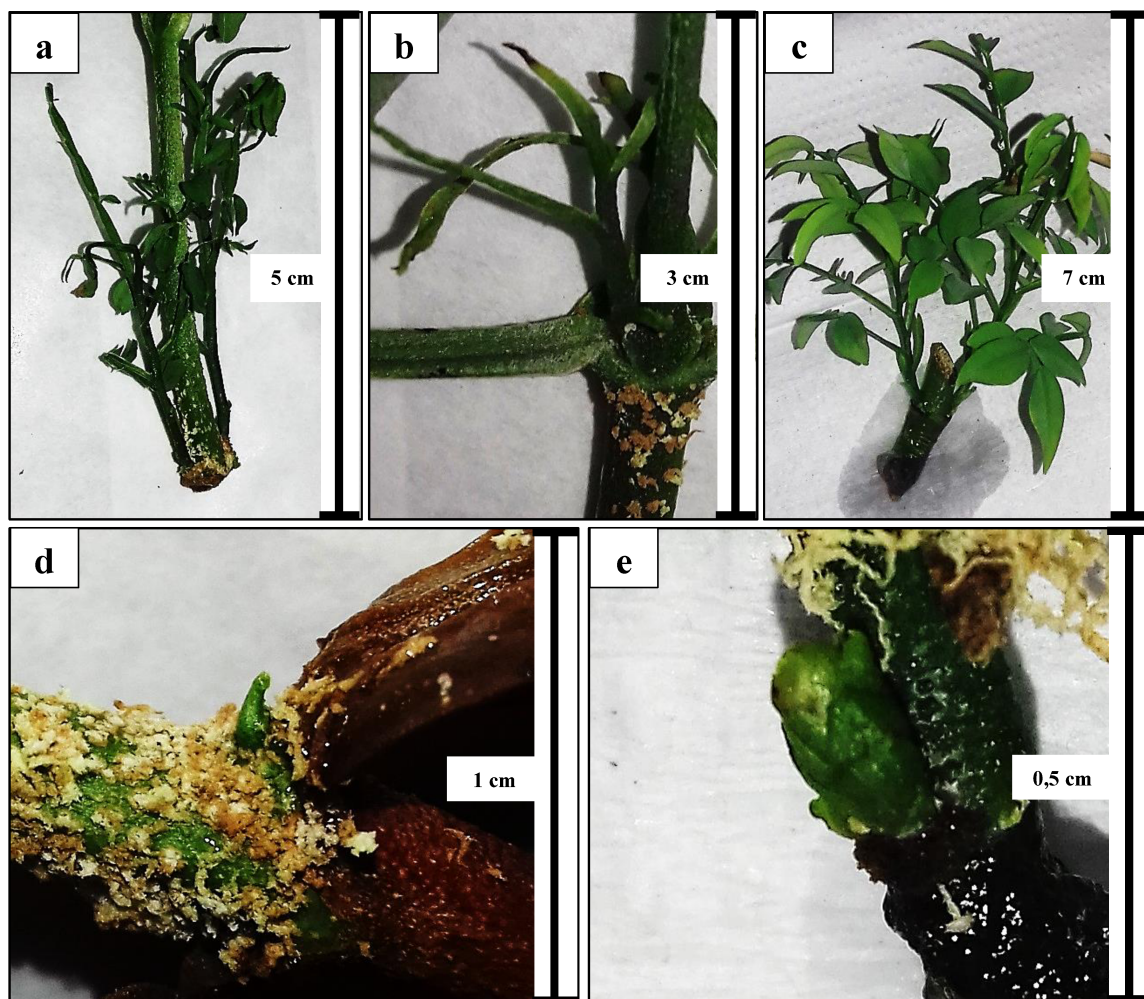


FIGURA 1. Brotações de explantes de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) *in vitro*. a) brotações basais no estabelecimento a partir de sementes; b) brotações superiores no estabelecimento a partir de sementes; c) brotações grandes no cultivo de segmentos nodais; d) localização das brotações basais no cultivo a partir de sementes; e) brotação pequena no cultivo de segmentos nodais. Uberlândia, MG, 2017.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1

As variáveis analisadas apresentaram resíduos com distribuição normal e variâncias homogêneas, exceto pelos dados referentes às brotações basais. Nesse caso, foi necessário realizar a transformação logarítmica ($\ln(x)$), o que adequou os valores, possibilitando a realização de testes paramétricos.

O comprimento da parte aérea, a massa fresca das raízes e as brotações foram influenciados pelo uso de fitorreguladores (TABELA 1). Enquanto dados do comprimento e da massa das raízes das plantas colaboram na percepção da influência dos fitorreguladores em seu crescimento, o número de brotações dos explantes é um fator de destaque, já que o desenvolvimento significativo de novos brotos ainda na fase de estabelecimento *in vitro* significaria a potencialização da multiplicação *in vitro* para a espécie.

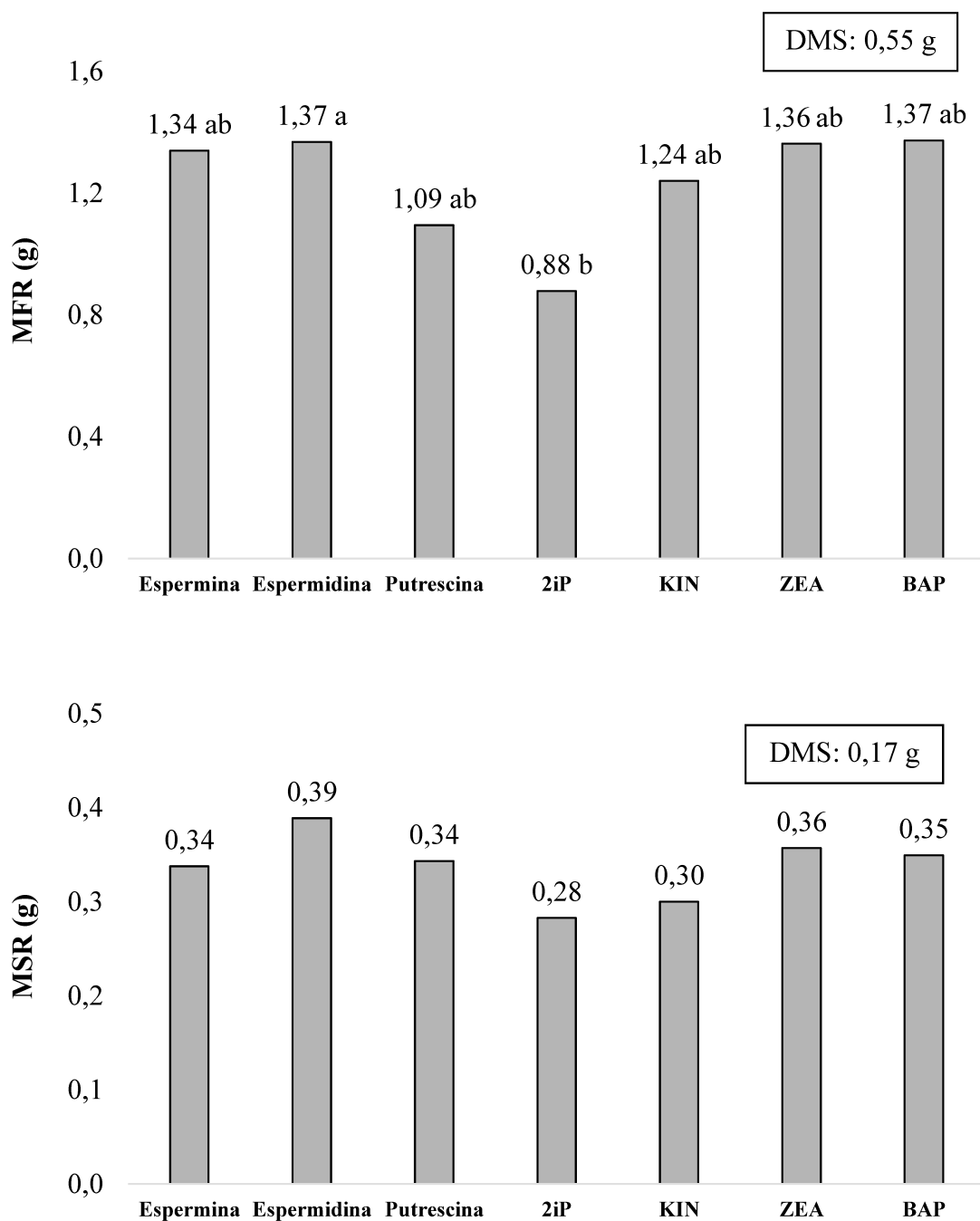
TABELA 1. Resumo da análise de variância para o comprimento da parte aérea – CPA (cm), comprimento das raízes - CR (cm), número de folhas, número de brotações basais, número de brotações superiores, número de brotações totais, teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), massa fresca da parte aérea – MFPA (g), massa fresca das raízes – MFR (g), massa seca da parte aérea – MSPA (g), massa seca das raízes – MSR (g) e teor de água (%) no cultivo *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meio contendo diferentes de fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

| Fontes de Variação | GL | Quadrados Médios | | | | | |
|--------------------|----|------------------|--------|--------|------------------|----------------------|------------------|
| | | CPA | CR | Folhas | Brotações basais | Brotações superiores | Brotações totais |
| Tratamentos | 6 | 1,66 * | 35,36 | 0,19 | 0,05 * | 0,18 * | 0,32 ** |
| Resíduo | 14 | 0,44 | 105,43 | 0,10 | 0,01 | 0,06 | 0,06 |
| CV (%) | | 6,20 | 31,67 | 17,56 | 20,53 | 58,84 | 11,01 |

| Fontes de Variação | GL | Quadrados Médios | | | | | |
|--------------------|----|-------------------|-------|--------|-------|-------|--------------|
| | | Teor de clorofila | MFPA | MFR | MSPA | MSR | Teor de água |
| Tratamentos | 6 | 13,19 | 0,14 | 0,13 * | 0,01 | 0,01 | 5,60 |
| Resíduo | 14 | 18,58 | 0,06 | 0,04 | 0,01 | 0,01 | 4,29 |
| CV (%) | | 9,12 | 13,51 | 16,17 | 16,79 | 17,81 | 2,81 |

* e ** – Dados significativos, ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Os explantes inoculados em meio com espermidina apresentaram os maiores valores de MFR (FIGURA 2), enquanto o tratamento com 2iP foi responsável pelos menores valores para tal característica. Os demais tratamentos mostraram resultados intermediários para MFR.



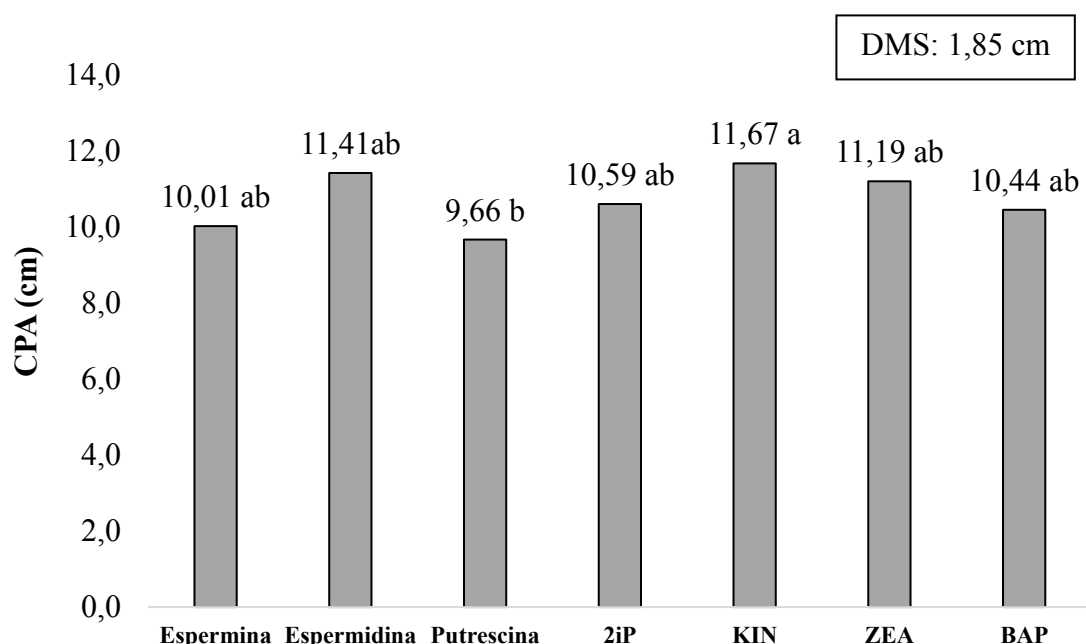
* Letras distintas indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 2. Massa fresca e seca das raízes (g) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) para diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

A influência da espermidina no aumento da MFR do baruzeiro pode ser um indicio do efeito da poliamina no enraizamento, todavia isso não foi confirmado na análise da massa seca, na qual, apesar da tendência semelhante ao comportamento da massa fresca, não foi observada a diferença estatística entre os fitorreguladores utilizados. Como agravante é preciso destacar que, na germinação *in vitro* do baruzeiro, observa-se uma formação radicular intensa, que por sua vez é afetada pela distribuição das raízes nos frascos. Tais características tendem a proporcionar uma grande variação no enraizamento, o que dificulta a análise precisa para essa característica quando se trabalha com sementes.

Couée et al. (2004) comentam sobre a presença de poliaminas em macromoléculas do sistema radicular, destacando que a redução de teores endógenos desses elementos pode afetar drasticamente o desenvolvimento das raízes. No entanto, a aplicação exógena desses fitorreguladores não é uma garantia de influência ao enraizamento *in vitro*, como observado por Francisco et al. (2008), que não atestaram efeito de putrescina, espermina e espermidina no enraizamento do taro (*Colocasia esculenta*).

Para o comprimento da parte aérea (FIGURA 3), a cinetina foi responsável pelo melhor desempenho, putrescina pelo menor crescimento enquanto os demais tratamentos foram responsáveis por valores intermediários de comprimento. Em todo caso, para todos os fitorreguladores, o nível de desenvolvimento da parte aérea é considerado satisfatório.



* Letras distintas indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 3. Comprimento da parte aérea – CPA (cm) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) para diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

A aplicação de fitorreguladores para a germinação *in vitro* do baruzeiro justifica-se como um esforço para antecipar a etapa de multiplicação, assim as características mais relevantes estudadas são aquelas que envolvem a formação de novas brotações. A influência dos compostos testados no crescimento da parte aérea e na massa das raízes funciona como um indicativo do efeito dessas moléculas, principalmente para etapas futuras do cultivo *in vitro* do baruzeiro. No entanto, no estabelecimento a partir de sementes, que mostram um bom desempenho nessa fase (PINHAL et al., 2017; SILVA et al., 2016b), é mais importante notar que os fitorreguladores testados não tiveram efeito nocivo aos explantes.

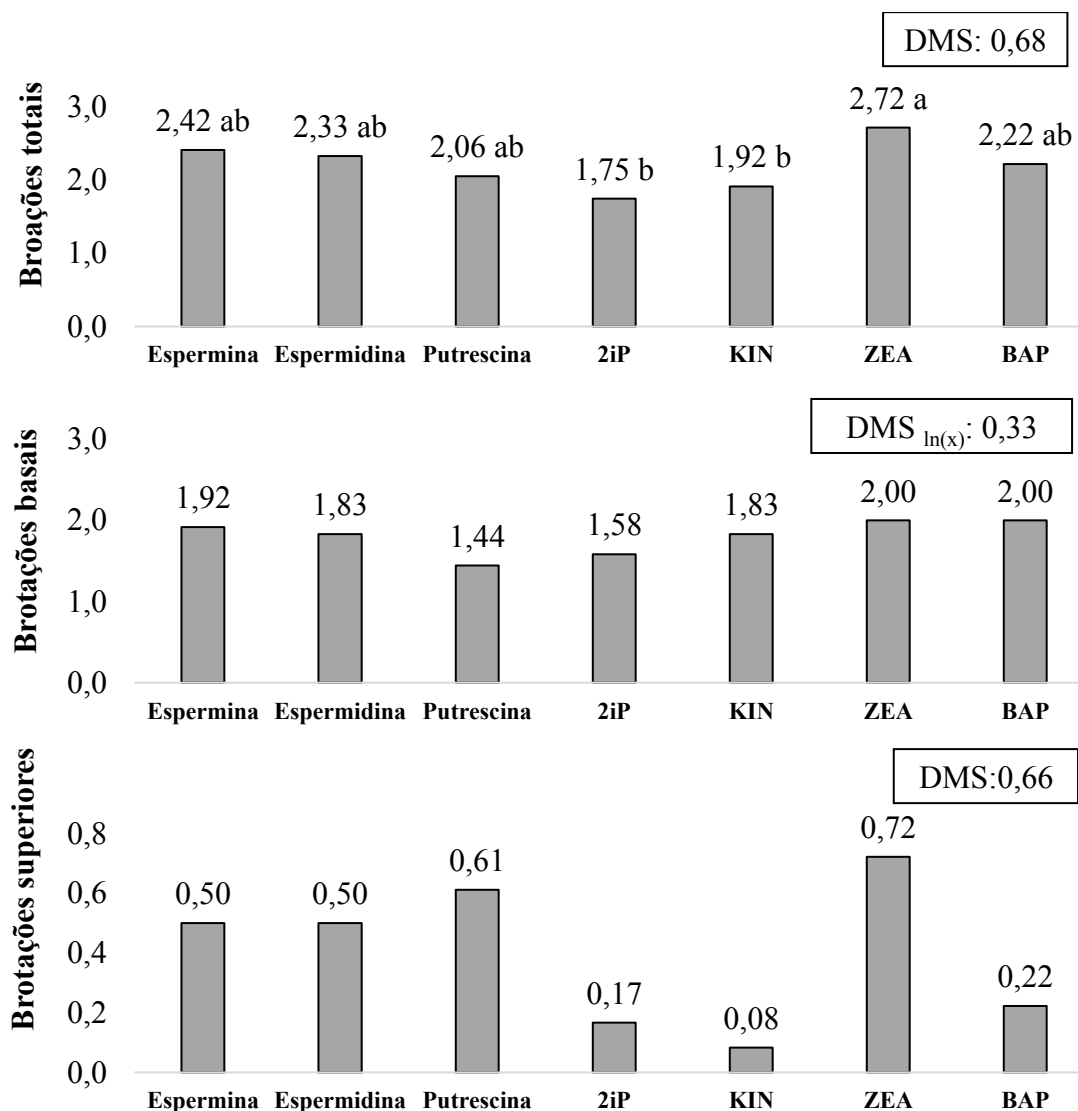
Quanto às brotações, apenas o total de brotações por explante foi afetado pelos fitorreguladores (FIGURA 4). Quando analisadas de forma separada, brotações basais e brotações superiores não mostraram diferença entre os tratamentos.

A zeatina foi o fitorregulador responsável pelos maiores valores de brotações totais por explante. Carvalho e Biasi (2004) testaram os fitorreguladores zeatina, thidiazuron (TDZ), 2iP e BAP na organogênese de segmentos radiculares de caqui, e a zeatina (1 μ M) foi a que proporcionou os melhores percentuais de brotação. Porém, a ação do fitorregulador depende da interação de diversos fatores, o que pode ser observado no trabalho de Leitzke, Damiani e Schuch (2010), os quais testaram diversas concentrações de zeatina, 2iP e BAP na multiplicação de duas cultivares ('Batum' e 'Heritage') de framboeseira que tiveram um melhor desempenho sob o efeito de diferentes citocininas: 2iP para 'Heritage' e zeatina para 'Batum'.

As brotações geradas nos tratamentos com zeatina tendem a ser um estímulo à multiplicação precoce de baruzeiros *in vitro*. Porém, para tanto, outros fatores devem ser considerados. A capacidade dessas brotações de se desenvolverem e formarem novos indivíduos, ou mesmo gerarem novas brotações em subcultivos deve ser comprovada. Por se tratar de um composto com custo elevado, a utilização do fitorregulador já no estabelecimento é dependente da intensificação da multiplicação nessa etapa e, para isso, seria importante testar outras doses dos fitorreguladores mais promissores, bem como sua combinação com outros compostos.

Nota-se que a performance superior do tratamento com zeatina foi diretamente afetada pelas brotações superiores, uma vez que, quando consideradas apenas as brotações basais, a média para zeatina foi estatisticamente idêntica à dos explantes cultivados com BAP e não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Destaca-se que brotações superiores foram encontradas em apenas 31,17%

das plantas avaliadas, o que torna o desempenho da zeatina dependente de uma transformação que ocorre em uma frequência inferior à desejável. Portanto, em estudos futuros visando a evolução da multiplicação na germinação *in vitro*, além da zeatina, outros fitorreguladores como o BAP podem ser levados em consideração.



* Letras distintas indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 4. Brotações totais, basais e superiores por explante no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) para diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

3.2 Experimento 2

Dentre as características analisadas, o número de folhas, brotações basais, brotações superiores e brotações totais não apresentaram normalidade dos resíduos e os dados referentes as brotações não apresentaram homogeneidade das variâncias. As diversas transformações testadas foram ineficazes para a adequação dos dados a testes

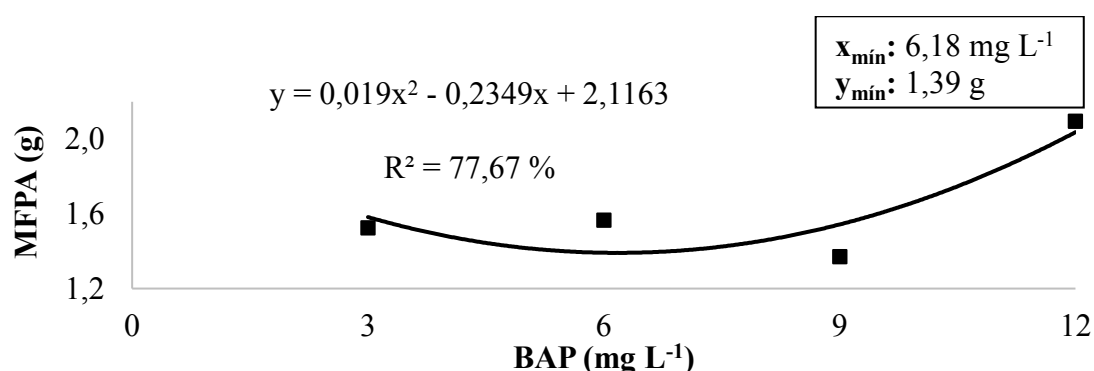
paramétricos. Dada a impossibilidade de utilização de testes não-paramétricos em um experimento em esquema fatorial, seguiu-se a análise de variância (TABELA 2). A única variável a apresentar diferença significativa foi a MFPA.

TABELA 2. Resumo da análise de variância para o comprimento - COMP (cm); número de folhas; teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$); massa fresca da parte aérea – MFPA (g); massa fresca das raízes – MFR (g); massa seca da parte aérea – MSPA (g); massa seca das raízes – MSR (g); número de brotações basais por explante - BB; número de brotações superiores por explante - BS e número de brotações totais por explante - BT no cultivo *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meios com diferentes doses de BAP com ou sem a adição de ANA. Uberlândia, MG, 2017.

| Fontes de Variação | GL | Quadrados Médios | | | | | | | | | |
|--------------------|----|------------------|--------|-------------------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| | | COMP | Folhas | Teor de clorofila | MFPA | MFR | MSPA | MSR | BB | BS | BT |
| ANA | 1 | 13,73 | 0,51 | 29,59 | 0,02 | 0,09 | 0,01 | 0,02 | 1,80 | 0,04 | 1,30 |
| BAP | 3 | 17,87 | 0,28 | 58,03 | 0,60 * | 0,27 | 0,04 | 0,01 | 0,71 | 0,05 | 0,71 |
| BAP X ANA | 3 | 2,05 | 0,34 | 9,21 | 0,18 | 0,16 | 0,03 | 0,01 | 1,12 | 0,01 | 0,97 |
| Resíduo | 16 | 8,65 | 0,22 | 28,21 | 0,12 | 0,25 | 0,03 | 0,02 | 1,72 | 0,05 | 1,93 |
| CV (%) | | 22,95 | 20,79 | 11,17 | 21,01 | 44,21 | 28,84 | 35,28 | 67,17 | 259,81 | 68,20 |

* – Dados significativos, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

Para a MFPA (FIGURA 5), observa-se uma redução com o aumento das doses de BAP, até $6,18 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, com massa fresca estimada em $1,39 \text{ g}$ por explante. A partir desse ponto, há uma tendência ao aumento da MFPA com valor máximo observado com a utilização de 12 mg L^{-1} de BAP. Todavia, esse resultado tem pouca relevância uma vez que, para as demais características, não foram detectadas diferenças significativas.



* Análise de Regressão ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 5. Massa fresca da parte aérea – MFPA (g) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) para diferentes doses (mg L^{-1}) de BAP. Uberlândia, MG, 2017.

Ao utilizar sementes como explantes, o desenvolvimento *in vitro* acaba fortemente influenciado pelos compostos presentes nessas sementes e a variação nas doses da citocinina e a inserção de ANA no meio de cultura mostra-se ineficiente para modificar

o comportamento normal da plântula, em especial, ineficaz no estímulo de multibrotações de forma precoce.

A variação das doses de BAP e a possibilidade da combinação com ANA tinha como objetivo, o aprimoramento no uso de fitorreguladores na etapa inicial do cultivo *in vitro* do baruzeiro. No entanto, isso só se justificaria com um incremento significativo no desenvolvimento da espécie, sobretudo a produção considerável de brotações. Sem isso, o uso dessas doses dos fitorreguladores, ainda no estabelecimento, é dispensável.

3.3 Experimento 3

Todas as características avaliadas mostraram homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos. A análise de variância (TABELA 3) mostrou efeito significativo dos fitorreguladores para o comprimento, massa fresca e massa seca das brotações, além do número de brotações pequenas e brotações totais por explante.

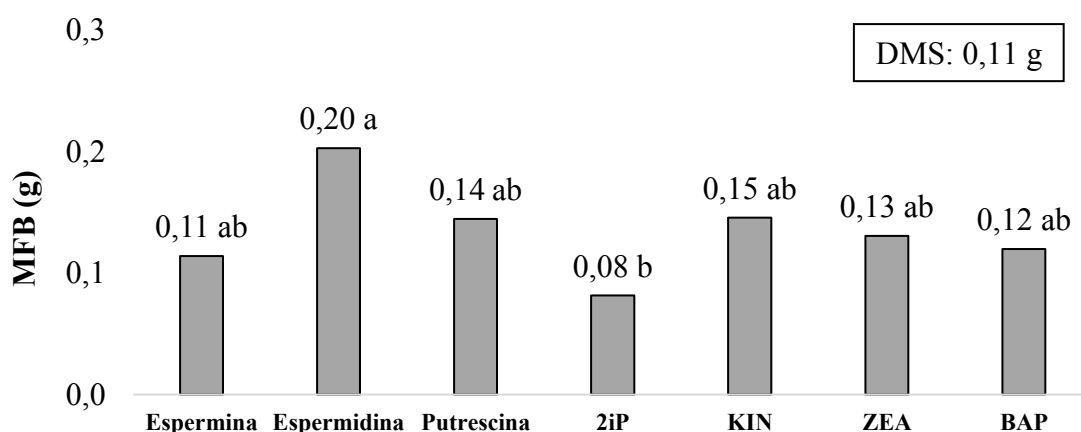
TABELA 3. Resumo da análise de variância para o comprimento das brotações – CB (cm), número de ramos, número de folhas, teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), massa fresca das brotações – MFB (g); massa seca das brotações – MSB (g); número de brotações grandes por explante - BG; número de brotações pequenas por explante - BP e número de brotações totais por explante - BT na multiplicação *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meio contendo diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

| Fontes de Variação | Quadrados Médios | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------------|-------|-------|--------|-------------------|-------|--------|-------|--------|--------|
| | GL | CB | Ramos | Folhas | Teor de clorofila | MFB | MSB | BG | BP | BT |
| Fitorreguladores | 6 | 0,54* | 1,82 | 0,76 | 13,84 | 0,00* | 0,00** | 0,07 | 2,06** | 2,22** |
| Resíduo | 14 | 0,17 | 1,61 | 0,37 | 11,11 | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,32 | 0,32 |
| CV (%) | | 21,39 | 26,99 | 38,41 | 9,50 | 28,42 | 21,72 | 16,07 | 20,38 | 14,31 |

* e ** – Dados significativos, ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

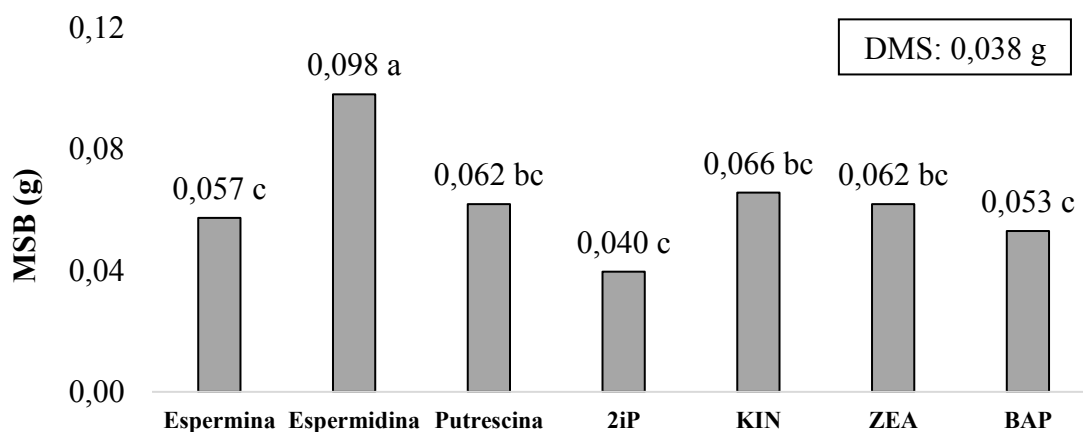
No entanto, o comprimento das brotações não apresentou diferenças entre os fitorreguladores comprovadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). A média de comprimento das brotações avaliadas foi de 1,93 cm, tamanho suficiente para que os brotos sejam levados à etapa de alongamento e enraizamento. A igualdade entre os tratamentos, mostra que nenhum dos fitorreguladores causou prejuízo ao crescimento das brotações em detrimento do estímulo à multiplicação.

Quanto a MFB (FIGURA 6), nota-se que o tratamento com espermidina proporcionou o melhor desempenho, sendo o único a diferenciar-se estatisticamente do pior tratamento, aquele utilizando 2iP. O uso dos demais fitorreguladores resultou em um ganho de massa intermediário. Os resultados obtidos na análise da massa seca (FIGURA 7) revelam uma resposta semelhante, com a espermidina como melhor tratamento, porém, nesse caso, BAP e espermina, juntamente com o 2iP, também foram responsáveis pelos menores ganhos de massa seca. Putrescina, zeatina e cinetina continuaram a representar valores intermediários de massa.



* Letras distintas indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 6. Massa fresca das brotações (g) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.



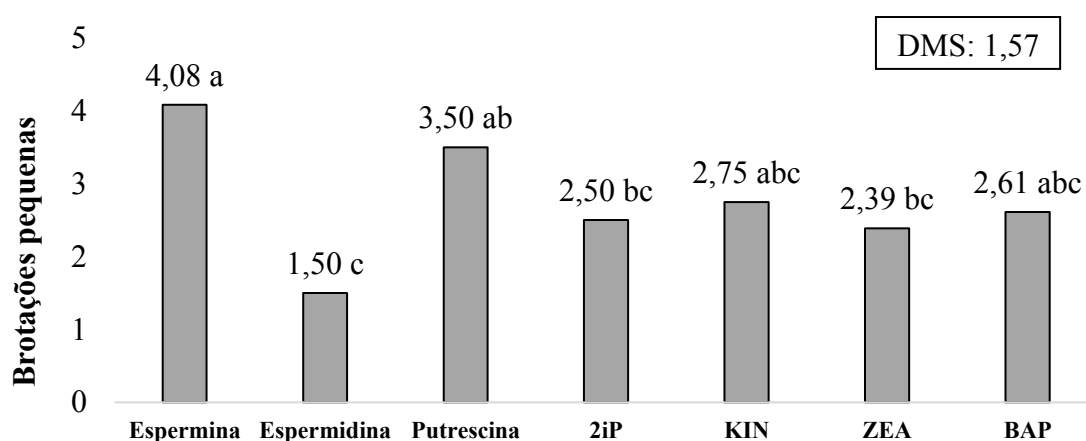
* Letras distintas indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 7. Massa seca das brotações (g) no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

Na análise das brotações (FIGURAS 8 e 9), a espermina foi o tratamento determinante para a maior quantidade de brotações pequenas e brotações totais por explante. A putrescina foi responsável pelo segundo melhor desempenho nas duas

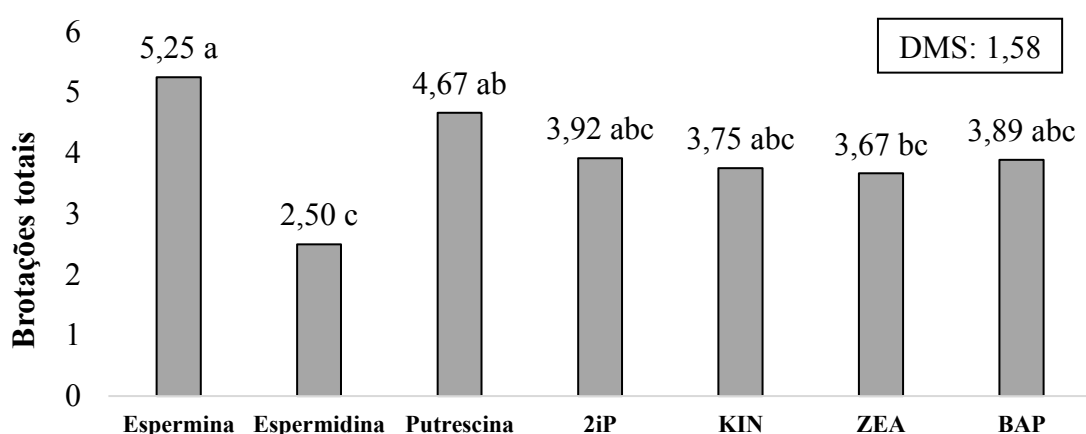
características, sendo o único entre os fitorreguladores restantes (2iP, cinetina, zeatina e BAP) a mostrar diferença para o fitorregulador que resultou no menor número de brotações, a espermidina.

Portanto, as poliaminas possuem destaque já que, para todas as variáveis comparadas, figuraram entre as melhores e piores médias. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato dessas moléculas estarem envolvidas em diversos processos do metabolismo celular, inclusive na divisão e diferenciação celular, mesmo em processos de cultivo *in vitro* (LUNA-ESQUIVEL et al., 2014; SCHONS; BRASIL, 1995).



* Letras distintas indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 8. Brotações pequenas no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.



* Letras distintas indicam médias diferentes pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 9. Brotações totais no cultivo *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) com diferentes fitorreguladores. Uberlândia, MG, 2017.

O trabalho de Mógor, Lima e Mógor (2007) com *Aloe vera* mostra resultados diferentes com o tratamento com espermidina, resultando em um maior número de perfilhos em comparação com espermina e BAP, porém os perfilhos foram observados

em quantidades superiores quando houve a utilização de espermina e espermidina combinadas. Debiasi, Fráguas e Lima (2007), trabalhando com *Hemerocallis* sp., observaram que a putrescina foi a poliamina responsável pela maior produção de brotos *in vitro*, porém foi com a combinação de espermina, espermidina e putrescina que os autores obtiveram os melhores percentuais de microplantas formadas. Tais estudos são um indicativo de que a combinação de poliaminas pode intensificar a multiplicação. Para o baruzeiro, a união das duas moléculas que tiveram desempenho superior (espermina e putrescina) pode ser uma alternativa interessante para otimizar o processo.

As brotações grandes, que se mostram como uma característica de grande variação, independente do tratamento, não tiveram seu comportamento alterado com a adição de fitorreguladores diferentes no meio de cultura, contudo o número de brotações grandes pode ser um fator diferencial para as brotações totais. Isso pode ser observado no desempenho dos explantes cultivados em meio com 2iP, já que, para as brotações pequenas, houve diferença significativa para o melhor tratamento (espermidina) enquanto para brotações totais (em que estão contabilizadas as brotações grandes) essa diferença deixou de existir.

Analisando apenas os tratamentos com citocininas, é possível identificar entre elas, um comportamento semelhante tanto para o ganho de massa quanto para a formação de brotos. A framboeseira cultivada *in vitro* mostrou uma reação diferente: o 2iP foi responsável pela formação de um maior número de gemas, seguido por BAP e zeatina (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010). As citocininas são os fitorreguladores mais comumente utilizados para a multiplicação *in vitro* e, em virtude da maior facilidade para obtenção e a quantidade de estudos discutindo seu funcionamento e ação em várias espécies, podem ser consideradas em pesquisas futuras, combinando-as a outros fitorreguladores e variando suas doses. O desempenho similar dessas moléculas para o baruzeiro possibilita a seleção da citocinina com menor custo e disponibilidade.

Constatada a capacidade da espermina e também da putrescina em estimular a brotação em segmentos nodais de baruzeiro, são necessários estudos que analisem o crescimento dessas brotações bem como a ação dos fitorreguladores em subcultivos para assim comprovar sua viabilidade.

3.4 Experimento 4

Os fatores testados mostraram homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos, com exceção da MFB e da MSB, sendo que para a MFB foi utilizada a transformação raiz quadrada (\sqrt{x}) e para MSB a transformação logarítmica ($\ln(x)$). Em ambos os casos, os dados foram ajustados, possibilitando a análise de variância (TABELA 4).

TABELA 4. Resumo da análise de variância para o comprimento das brotações (cm), número de ramos, número de folhas, teor de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$), massa fresca das brotações – MFB (g); massa seca das brotações - MSB (g); número de brotações grandes por explante - BG; número de brotações pequenas por explante - BP e número de brotações totais por explante - BT na multiplicação *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meio contendo diferentes concentrações de BAP e ANA. Uberlândia, MG, 2017.

| Fontes de Variação | GL | Quadrados Médios | | | | | | | | |
|--------------------|----|------------------|-------|--------|-------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | | Comprimento | Ramos | Folhas | Teor de clorofila | MFB | MSB | BG | BP | BT |
| ANA | 1 | 0,042 | 0,05 | 0,00 | 43,36 | 0,00 | 0,00 | 0,06 | 0,49 | 0,91 |
| BAP | 3 | 0,31 | 0,37 | 1,46 | 28,07 | 0,05 | 0,00 | 0,07 | 0,58 | 0,73 |
| BAP X ANA | 3 | 1,58** | 4,68* | 1,79 | 33,97 | 0,59** | 0,01** | 0,18** | 1,86** | 1,49* |
| Resíduo | 16 | 0,17 | 0,97 | 0,74 | 15,12 | 0,09 | 0,00 | 0,03 | 0,29 | 0,31 |
| CV (%) | | 20,77 | 18,97 | 49,28 | 11,02 | 14,86 | 14,43 | 16,48 | 27,67 | 18,26 |

* e ** – Dados significativos, ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F

Observou-se um efeito significativo dos fitorreguladores no comprimento das brotações, número de ramos por brotação, MFB, MSB, brotações grandes, brotações pequenas e brotações totais. Para todos os casos, o efeito observado foi na interação entre BAP e ANA.

Quando o BAP foi utilizado nas doses de 9 ou 12 mg L⁻¹, observa-se uma melhor performance com a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de ANA nos casos em que a variação da auxina teve efeito significativo. Já com o uso de 3 ou 6 mg L⁻¹ de BAP, o efeito foi contrário e a dose de 0,25 mg L⁻¹ de ANA resultou em um melhor desenvolvimento das plantas (TABELA 5 e TABELA 6). A única exceção foi para brotações grandes com o uso de 6 mg L⁻¹ de BAP e 0,25mg L⁻¹ de ANA.

As citocininas possuem papel importante na divisão celular, já as auxinas, dentre outras funções, atuam no alongamento das células. A combinação desses dois tipos de

hormônios vegetais é vital na organogênese e desenvolvimento vegetal, sendo o efeito de um hormônio dependente da presença ou concentração do outro.

Monfort et al. (2012) afirmam que o balanço e a interação dos fitorreguladores, bem como a quantidade endógena dos hormônios vegetais, são decisivos nas transformações morfogênicas dos explantes, além disso, auxinas e citocininas podem ser necessárias em conjunto para estimular uma transformação *in vitro*, porém, conforme a concentração dessas moléculas no explante e no meio de cultivo, pode haver efeito inibitório entre os hormônios das duas classes. Portanto é importante encontrar combinação ideal de auxinas e citocininas para cada etapa do cultivo *in vitro*. Para a multiplicação de segmentos nodais de baruzeiro, observa-se que a dose de 0,5 mg L⁻¹ de ANA se adequa às doses de BAP superiores a 6 mg L⁻¹.

TABELA 5. Características de desenvolvimento do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) *in vitro* em meios de cultivo com 0,25 ou 0,5 mg L⁻¹ de ANA e doses variadas de BAP (mg L⁻¹). Uberlândia, MG, 2017.

| BAP | ANA | | | | | | | |
|-----|------------------|--------|-----------------|--------|---------|---------|---------|---------|
| | 0,25 | 0,5 | 0,25 | 0,5 | 0,25 | 0,5 | 0,25 | 0,5 |
| | Comprimento (cm) | | Número de ramos | | MFB (g) | | MSB (g) | |
| 3 | 2,47 a | 1,23 b | 5,92 a | 4,50 a | 0,184 a | 0,122 a | 0,081 a | 0,059 a |
| 6 | 2,62 a | 1,23 a | 5,89 a | 4,50 a | 0,189 a | 0,105 b | 0,083 a | 0,053 a |
| 9 | 1,68 a | 2,02 a | 4,83 a | 4,94 a | 0,114 b | 0,211 a | 0,054 b | 0,100 a |
| 12 | 1,32 b | 2,37 a | 4,33 b | 6,67 a | 0,091 b | 0,168 a | 0,047 b | 0,085 a |

¹ Médias seguidas por letras distintas, dentro da mesma característica, diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

TABELA 6. Brotações na multiplicação *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.) em meios de cultivo com 0,25 ou 0,5 mg L⁻¹ de ANA e doses variadas de BAP (mg L⁻¹). Uberlândia, MG, 2017.

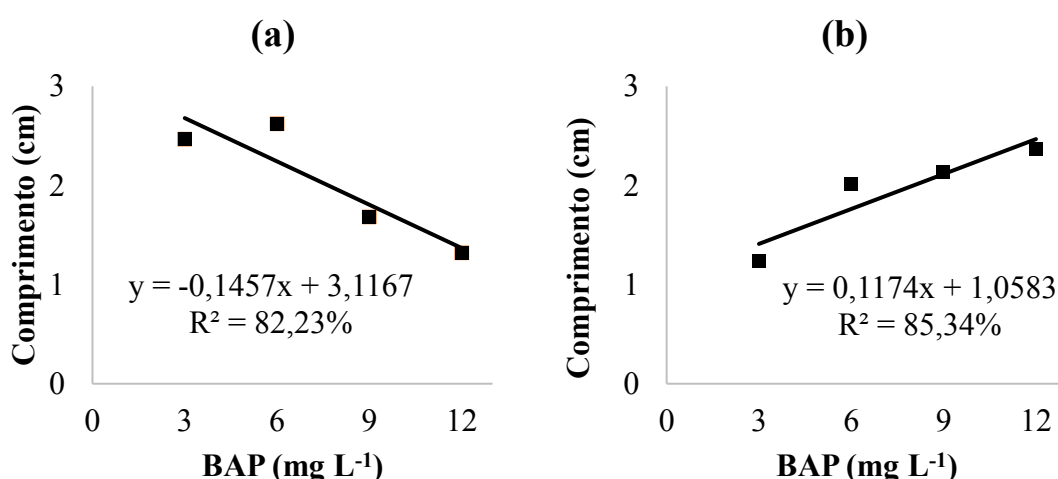
| BAP | ANA | | ANA | | ANA | |
|-----|-------------------|--------|--------------------|--------|------------------|--------|
| | 0,25 | 0,5 | 0,25 | 0,5 | 0,25 | 0,5 |
| | Brotações Grandes | | Brotações Pequenas | | Brotações Totais | |
| 3 | 1,33 a | 1,00 b | 1,75 a | 2,31 a | 3,08 a | 3,31 a |
| 6 | 0,83 b | 1,33 a | 1,83 a | 1,25 a | 2,67 a | 2,58 a |
| 9 | 0,83 a | 1,00 a | 2,25 a | 1,67 a | 3,08 a | 2,67 a |
| 12 | 1,08 a | 1,17 a | 1,42 b | 3,17 a | 2,50 b | 4,33 a |

¹ Médias seguidas por letras distintas, dentro da mesma característica, diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Lima et al. (2007), trabalhando com *Mentha viridis*, observaram comportamento semelhante. Na concentração de 1 mg L⁻¹ de BAP, a dose de 0,25 mg L⁻¹ de ANA

proporcionou maiores valores de massa fresca da parte aérea em comparação à dose de 0,5 de ANA. Quando a concentração de BAP foi ampliada para 2 mg L⁻¹, o resultado foi oposto.

As características de crescimento são importantes, pois trazem parâmetros da viabilidade da brotação como novo explante. Observando o comprimento das brotações grandes (FIGURA 10), nota-se uma tendência inversa de acordo com a concentração de ANA. Ao se utilizar 0,25 mg L⁻¹ de ANA o acréscimo de BAP tende a reduzir o comprimento das brotações (comprimento máximo estimado em 2,68 cm), já com 0,5 mg L⁻¹ de ANA, o BAP estimula o crescimento das brotações (comprimento máximo estimado em 2,47 cm). Os valores máximos de comprimento calculados para ambos os casos (2,68 e 2,47 cm) são próximos e considerados aceitáveis para a utilização dessas brotações como novo explante.

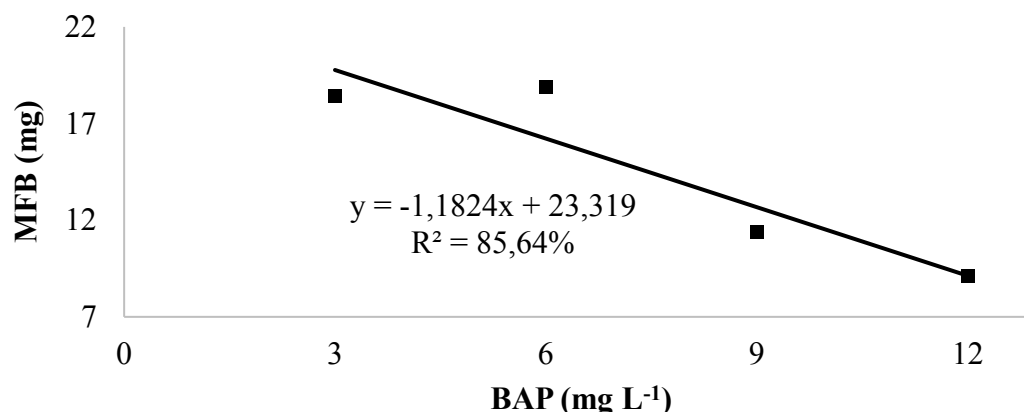


* Análise de Regressão ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 10. Comprimento das brotações (cm) em diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,25 (a) ou 0,5 mg L⁻¹ (b) de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.

Considerando somente o comprimento, a opção com menor quantidade de fitorreguladores (0,25 mg L⁻¹ de ANA e 3 mg L⁻¹ de BAP) seria a mais vantajosa devido à necessidade constante de redução de custos na cultura de tecidos. A análise da massa fresca (FIGURA 11), para a qual o efeito do BAP foi significativo apenas em combinação com a menor dose de ANA, também indica um decréscimo com o incremento de BAP. É válido ressaltar que, para a massa seca, em nenhum caso houve efeito significativo do

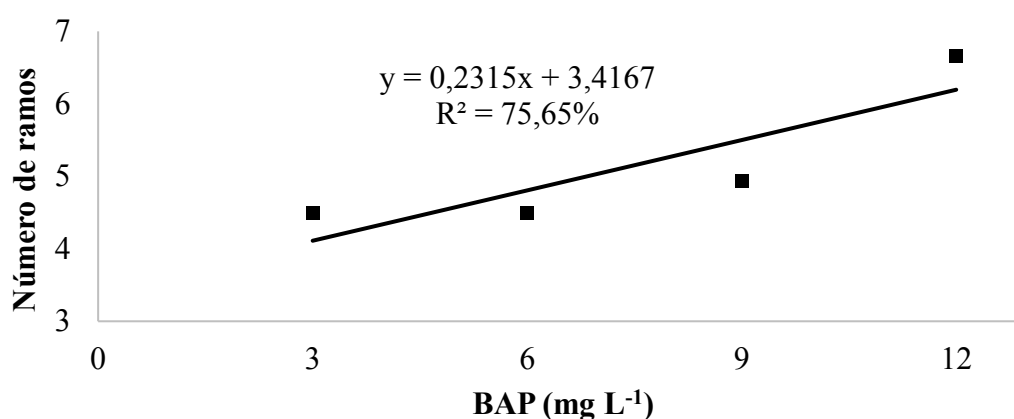
BAP, assim a redução da massa fresca observada anteriormente não representa uma diminuição na síntese de massa vegetal, e sim um menor acúmulo de água nos tecidos.



* Análise de Regressão ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 11. Massa fresca das brotações – MFB (mg) por explante em diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,25 mg L⁻¹ de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.

Dentre os fatores estudados, o último diretamente relacionado ao desenvolvimento das brotações foi o número de ramos (FIGURA 12), para o qual observa-se a ação do BAP apenas em tratamentos com 0,5 mg L⁻¹ de ANA. Diferente da tendência observada nos casos anteriores, a adição de BAP ao meio colaborou na ramificação das plantas *in vitro*. Apesar de não ser uma característica essencial para essa etapa do cultivo *in vitro*, ela serve como indicação do bom desenvolvimento das brotações.



* Análise de Regressão ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 12. Número de ramos por explante em diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,5 mg L⁻¹ de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.

Fermino Junior e Scherwinski-Pereira (2012), trabalhando com uma espécie da mesma família do baruzeiro, a cerejeira-da-amazônia (*Amburana acreana*), observaram a redução na altura dos brotos com o acréscimo de BAP (até 8 mg L⁻¹) em combinação com 0,1 mg L⁻¹ de ANA. Já no trabalho realizado por Araruna (2015) para a multiplicação do baruzeiro, observa-se um comportamento contrário com o aumento na massa fresca e comprimento das plantas à medida que a concentração de BAP no meio é elevada (até 4 mg L⁻¹) em meio contendo 0,25 mg L⁻¹ de ANA. No entanto, nesse caso, os explantes utilizados foram ápices caulinares ao invés de segmentos nodais, o que pode diferenciar o desenvolvimento a partir do estímulo com fitorreguladores. Essa diferença no comportamento dos explantes, mesmo para a mesma espécie, pode ser observada no experimento de Sá et al. (2016), em que explantes da mesma categoria, mas de diferentes acessos de jenipapeiro, tiveram comportamentos diferentes quanto ao surgimento de brotações adventícias quando submetidas a tratamentos com duas doses de BAP.

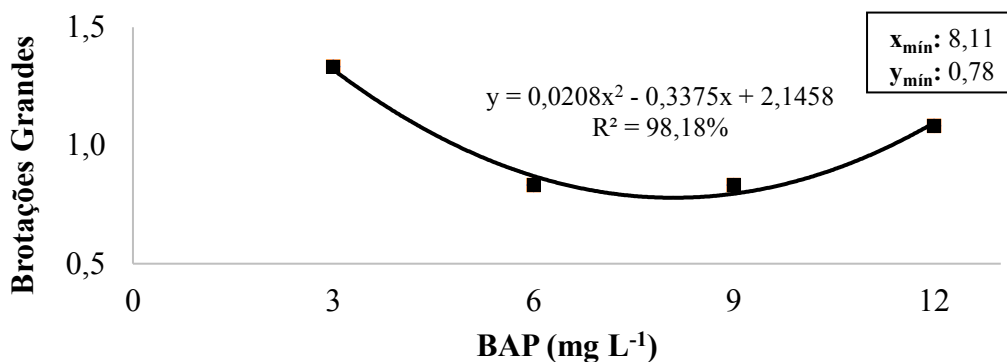
Quanto ao efeito do BAP nas brotações, ele só foi significativo para brotações grandes com ANA a 0,25 mg L⁻¹ e para brotações pequenas e brotações totais com ANA a 0,5 mg L⁻¹.

A formação de brotações grandes (FIGURA 13) é uma importante característica, uma vez que correspondem a brotações que já estão aptas para o alongamento e enraizamento *in vitro*. Essas brotações foram obtidas em maior número com o uso de 3 mg L⁻¹ de BAP (ANA 0,25 mg L⁻¹). Doses de 6 e 9 mg causaram a redução dessas brotações, porém na concentração de 12 mg L⁻¹ há o crescimento em seu número, o que indica que a partir desse ponto pode ser possível a obtenção de mais brotações desse tipo, sendo necessários estudos que confirmem essa hipótese. Na concentração de ANA 0,5 mg L⁻¹, a variação do BAP não alterou a formação de brotações grandes, apesar disso, o número destas brotações para esses tratamentos não pode ser considerado pequeno dado o comportamento geral da espécie nas condições do experimento.

Para o número de brotações pequenas e brotações totais com ANA a 0,5 mg L⁻¹ (FIGURA 14), há um desempenho semelhante, com uma tendência a maior formação de brotações na concentração de 12 mg L⁻¹ de BAP. Considerando o comportamento observado no gráfico, seria interessante a realização de trabalhos com doses superiores da citocinina esperando ainda mais brotos formados.

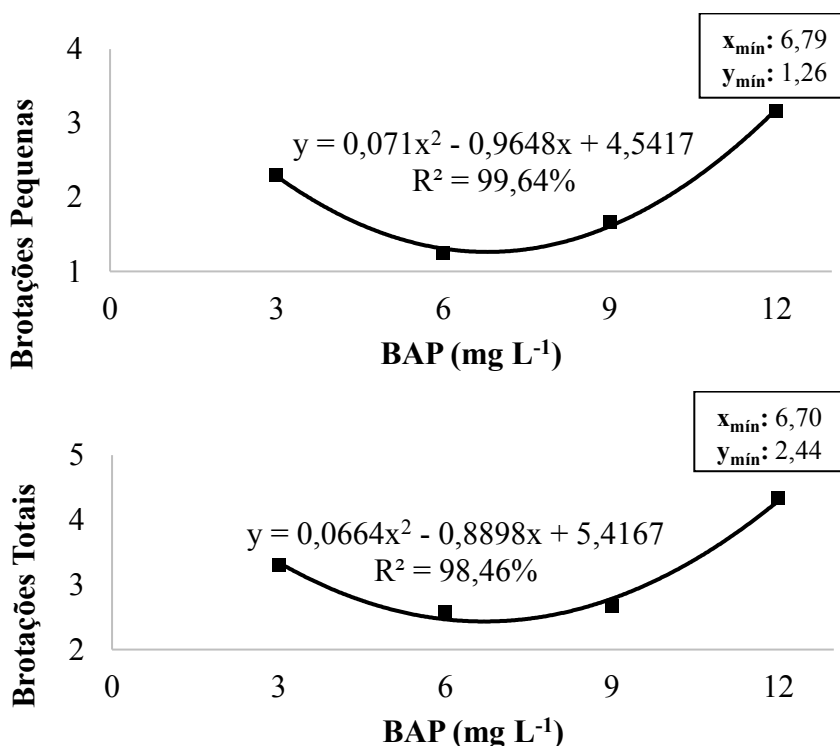
Silva (2012) apresenta resultados que vão de acordo com aqueles aqui apresentados, obtendo o maior número de brotações de baruzeiro na utilização de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e a dose máxima de BAP testada (4 mg L⁻¹). O trabalho de Araruna (2015)

também resultou em uma quantidade superior de brotações na multiplicação do baruzeiro na dose máxima de BAP testada (4 mg L⁻¹). De maneira promissora, o número máximo de brotações estimado no presente trabalho (4,3 brotos por explante) na combinação de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 12 mg L⁻¹ de BAP é superior àquele apresentado em outros estudos realizados com a espécie.



* Análise de Regressão ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 13. Brotações grandes por explante em diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,25 mg L⁻¹ de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.



* Análise de Regressão ($\alpha = 0,05$)

FIGURA 14. Brotações pequenas e brotações totais por explante em diferentes concentrações de BAP em combinação 0,5 mg L⁻¹ de ANA na multiplicação *in vitro* de baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Uberlândia, MG, 2017.

Tais dados refletem o potencial de multiplicação *in vitro* para o baruzeiro mediante a utilização desses fitorreguladores. A combinação de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 12 mg L⁻¹ de BAP mostra-se a mais promissora, uma vez que gera o maior número de brotações sem prejuízos ao seu crescimento. É necessário, ainda, confirmar a viabilidade futura das brotações obtidas nesse processo com sua utilização como explantes e multiplicação em subcultivos.

4 CONCLUSÕES

4.1 Experimento 1

A zeatina foi o fitorregulador que se mostrou mais benéfico, pois proporcionou o maior número de brotações por explante na germinação *in vitro* do baruzeiro.

Estudos complementares que validem a técnica são necessários, sendo que, além da zeatina, outros fitorreguladores, em especial o BAP, devem ser considerados.

4.2 Experimento 2

A variação das doses de BAP e a combinação com ANA são desnecessárias no estabelecimento *in vitro* a partir de sementes de baruzeiro.

4.3 Experimento 3

As diferentes citocininas apresentam efeito semelhante para as características estudadas.

A espermina foi o fitorregulador que proporcionou maiores benefícios para a multiplicação *in vitro* do baruzeiro.

4.4 Experimento 4

A multiplicação *in vitro* do baruzeiro em concentrações de BAP superiores a 6 mg L⁻¹ é favorecida pela combinação com 0,5 mg L⁻¹ de ANA.

A combinação de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 12 mg L⁻¹ de BAP é a mais promissora para gerar brotações em segmentos nodais de baruzeiro.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nos resultados obtidos nos quatro experimentos constatou-se a capacidade do baruzeiro em responder ao estímulo dos fitorreguladores no cultivo *in vitro*. Observa-se, também, que o controle da resposta do baruzeiro não é simples e diretamente relacionado ao explante utilizado.

A inserção de fitorreguladores, ainda no estabelecimento *in vitro* a partir de sementes, é uma opção que necessita de estudos complementares, considerando o custo do método e a intensidade de multiplicação observada nessa etapa, que pode ser considerada pequena em comparação ao uso de segmentos nodais. Além disso, a facilidade na utilização de sementes se contrapõe à necessidade de produção de brotos de maneira precoce. No entanto, dado o período superior a 100 dias observado na multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais, uma vez que, para fruteiras como a bananeira e o abacaxizeiro, essa etapa pode ser realizada com mais rapidez (SILVA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011), a multiplicação, já no momento do estabelecimento, torna-se uma alternativa para reduzir etapas e acelerar o processo. Para tornar isso possível, é necessária a existência de estudos visando à otimização do processo, avaliando o emprego de técnicas como o cultivo em biorreatores.

Já a utilização de segmentos nodais é promissora e as respostas observadas tanto com o uso de espermina e putrescina quanto no emprego de doses elevadas de citocinina, no caso o BAP, tornam a multiplicação *in vitro* possível. Porém, com o objetivo de elevar a eficiência do processo e assim a produção final de mudas, é necessário comprovar a eficácia dos sistemas testados, através de subcultivos, uma vez que eles maximizam de forma considerável o número de brotos produzidos por explante, sobretudo quando realizados em conjunto com técnicas como o uso de biorreatores e a utilização combinada de meios de cultivo líquido, como observado por Scherwinski-Pereira et al. (2012) para o abacaxizeiro. Trabalhos que relacionem essas técnicas ao baruzeiro seriam benéficos ao cultivo *in vitro* da fruteira.

Além dos dados apresentados é importante relatar a presença de calos em diversos tratamentos nos experimentos com segmentos nodais, sendo que a maior parte deles se mostrou capaz de gerar brotações. A incidência dos calos não foi suficiente para ser avaliada, no entanto torna possível a pesquisa de técnicas, como a embriogênese

somática, que se aproveitem da formação de calos no baruzeiro para intensificar a sua multiplicação.

Pode-se concluir que a multiplicação *in vitro* do baruzeiro mediante o estímulo de fitorreguladores é possível. As informações obtidas nesse estudo são de grande relevância na produção de um protocolo completo para o cultivo *in vitro* do baruzeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.T. Apresentação. In: SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso**. Planatina: Embrapa Cerrados, 2004 (Documentos, 116). p. 7-8.
- ARARUNA, E. C. **Propagação *in vitro* de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.)**. 67 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2015.
- CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1401-1406, set./out. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n5/a12v34n5.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2017.
- COUÉE, I. et al. Involvement of polyamines in root development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Haia, v. 76, p. 1-10, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1025895731017>>. Acesso em: 05 abr. 2017.
- DEBIASI, C.; FRÁGUAS, C. B.; LIMA, G. P. P. Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p.1014-1020, jul./ago. 2007.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith – Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, jan./mar. 2012.
- FRANCISCO, A. A. et al. Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1251-1257, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n5/a08v38n5.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2017.
- GAMBATTI, M. et al. Germinação *in vitro* de sementes de baru (*Dipteryx alata* Vogel). In: **I INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY**, Videira - SC, 2015.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M.W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, mar./abr. 2010.
- LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 669-671, jul. 2007.
- LUNA-ESQUIVEL, N. et al. Poliaminas como indicadores de estrés en plantas. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, Texcoco de Mora, v. 20, n. 3, p. 283-295, 2014.

- MÓGOR, G.; LIMA, G. P. P.; MÓGOR, A. F. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 37-47, 2007.
- MONFORT, L. E. F. et al. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, n., p.458-463, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, H. S. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa spp.*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 41, n. 3, p. 369 – 376, 2011.
- PINHAL, H. F. **Estabelecimento *in vitro* do baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.).** 54 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2012.
- PINHAL, H. F. et al. Concentration of ms medium and cutting of seeds on *in vitro* establishment of baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). **Bioscienci Jornal**, Uberlândia, v. 33, n. 2, p. 306-313, mar./apr. 2017.
- SÁ, F. P. et al. *In vitro* propagation and acclimatization of genipapo accessions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 2, p. 155-163, mar./apr. 2016.
- SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. (Documentos, 116).
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Haia, v. 109, n. 2, p. 263–269, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-011-0091-8>>. Acesso em: 07 abr. 2017.
- SCHONS, J.; BRASIL, O. G. Poliaminas na embriogênese somática em cenoura (*Daucus carota* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 3, p. 534-536, set./dez. 1995.
- SILVA, A. B. et al. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, set. 2007.
- SILVA, H. F. J. et al. Alternative supplements and ms medium concentrations in the *in vitro* establishment of *Dipteryx alata* Vog. **Bioscienci Jornal**, Uberlândia, v. 32, n. 5, p. 1138-1146, sept./oct. 2016a.
- SILVA, H. F. J. et al. *In vitro* establishment and early development of barueiro (*Dipteryx alata* Vogel). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 1779-1790, jul./ago. 2016b.

SILVA, L. C. **Germinação, estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Eugenia dysenterica* DC. E *Dipteryx alata* Vogel, espécies frutíferas do Cerrado.** 92 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-Graduação em Genética & Melhoramentos de Plantas, Goiânia, Goiás, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4967>>. Acesso em: 05 abr. 2017.