



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA, CULTIVO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
BARUEIRO DE OCORRÊNCIA NATURAL DO CERRADO GOIANO

MARIANA SILVA PEREIRA DE PAULA

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

MARIANA SILVA PEREIRA DE PAULA

CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA, CULTIVO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
BARUEIRO DE OCORRÊNCIA NATURAL DO CERRADO GOIANO

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

Orientador

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

Coorientadora

Dr^a. Muza do Carmo Vieira

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

P324c
2018

Paula, Mariana Silva Pereira de, 1994

Caracterização biométrica, cultivo e conservação in vitro de barueiro de ocorrência natural do Cerrado goiano / Mariana Silva Pereira de Paula. - 2018.

93 p. : il.

Orientador: José Magno Queiroz Luz.

Coorientadora: Muza do Carmo Vieira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.743>

Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Árvores frutíferas - Cultivo - Teses. 3. Cultura tecidual - Teses. 4. Biometria - Teses. I. Luz, José Magno Queiroz, 1967- II. Vieira, Muza do Carmo. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU: 631

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

MARIANA SILVA PEREIRA DE PAULA

CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA, CULTIVO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
BARUEIRO DE OCORRÊNCIA NATURAL DO CERRADO GOIANO

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

APROVADA em 09 de fevereiro de 2018.

Dra. Muza do Carmo Vieira IFGoiano

Dra. Simone Abreu Asmar UFU

Dra. Eli Regina Barboza de Souza UFG



Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Aos meus pais, Vânia Maria e Daniel e
À minha irmã, Renata

Dedico.

À Angélica e à minha coorientadora, Muza

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre guiando meus passos e sendo meu refúgio e fortaleza em todos os momentos desta minha caminhada.

Aos meus pais Vânia e Daniel e à minha irmã Renata, pelo constante apoio e imenso carinho dedicado.

Ao meu namorado Aldemir, pela compreensão, incentivo e imprescindível ajuda para que eu alcançasse esta conquista.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação e ao Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, pela parceria no desenvolvimento do trabalho com a infraestrutura e o apoio na condução da pesquisa através do Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC).

Ao professor José Magno Queiroz Luz e à Muza do Carmo Vieira, pela orientação e coorientação, e pelo total incentivo nas horas mais difíceis, pela paciência, interesse e compreensão decisivos em todos os aspectos.

Aos meus colegas de laboratório, Dalilla, Lídia, Thimóteo e Marina, por todos os momentos compartilhados na ajuda da condução dos experimentos. À Sabrina, Danyela, Rayssa e Herick que de uma forma ou de outra participaram dessa breve e intensa caminhada.

Aos participantes da banca examinadora, que também dividirão comigo esse momento tão importante e esperado: Dr^a. Eli Regina Barboza de Souza e Dr^a. Simone Abreu Asmar.

À CAPES, à FAPEMIG e à AGRÍCOLA WEHRMANN, em nome de Rodrigo e José de Almeida, pela imensurável compreensão das minhas ausências no trabalho para a tão sonhada conclusão desse estudo.

Minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2. O BIOMA CERRADO	4
2.1.1. Aspectos Gerais	4
2.2. FRUTÍFERAS NATIVAS DO CERRADO	7
2.3. BARUEIRO	10
2.3.1. Origem e distribuição.....	10
2.3.2. Aspectos botânicos.....	11
2.3.3. Aspectos ecológicos.....	14
2.3.4. Potencial socioeconômico.....	15
2.3.5. Mercado	16
2.4. CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA DE FRUTOS E SEMENTES	18
2.5. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS DE ESPÉCIES DO CERRADO	19
2.5.1. Micropropagação	20
2.6. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS.....	23
2.6.1. Conservação <i>in vitro</i> por crescimento lento.....	24
3 REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES E BIOMETRIA DE FRUTOS, SEMENTES E PLÂNTULAS GERMINADAS <i>in vitro</i> DE BARUEIRO DO CERRADO GOIANO.....	36
1 RESUMO	36
2 ABSTRACT	37
3 INTRODUÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40

4.1. Prospecção, seleção e caracterização das matrizes de barueiro	40
4.2. Caracterizações biométricas de frutos e sementes de barueiro.....	42
4.3. Germinação de sementes e caracterização biométrica de plântulas <i>in vitro</i> de barueiro	43
4.4. Delineamento experimental e procedimentos estatísticos	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Caracterização das matrizes e biometria de frutos e sementes de barueiro	47
5.2. Biometria de plântulas de diferentes matrizes cultivadas <i>in vitro</i>	51
5.3. Correlação entre caracteres biométricos de matrizes, frutos, sementes e de plântulas de diferentes matrizes cultivadas <i>in vitro</i>	56
6 CONCLUSÕES	60
7 REFERÊNCIAS.....	61
CAPÍTULO 3: CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MATRIZES DE BARUEIRO POR CRESCIMENTO LENTO	64
1 RESUMO	64
2 ABSTRACT	65
3 INTRODUÇÃO	66
4 MATERIAL E MÉTODOS	68
4.1. ETAPA 1: Conservação <i>in vitro</i> de barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog). em diferentes temperaturas e agentes osmóticos.....	68
4.2. ETAPA 2: Retomada do crescimento dos segmentos nodais de barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog.), conservados <i>in vitro</i>	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1. ETAPA 1: Conservação <i>in vitro</i> de barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) em diferentes temperaturas e agentes osmóticos.....	73
5.2. ETAPA 2: Retomada do crescimento dos segmentos nodais de <i>D. alata</i> Vog., conservados <i>in vitro</i> ;	86
6 CONCLUSÕES	89
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
8 REFERÊNCIAS.....	91

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

TABELA 1 – Coordenadas geográficas das matrizes de barueiro, selecionadas para a realização do estudo, provenientes do Cerrado Goiano. Urutaí-GO, 2018.41

Capítulo 3

TABELA 1 – Tratamentos utilizados para a conservação *in vitro* de segmentos nodais de Barueiro em duas temperaturas e diferentes concentrações e agentes osmóticos (Manitol e Sorbitol), sob regime de crescimento lento. Urutaí-GO, 2018.69

TABELA 2 – Tratamentos utilizados para a retomada de crescimento dos segmentos nodais de barueiro, advindos da conservação *in vitro* sob as temperaturas de 18° e 20°C, submetidos a diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP). Urutaí-GO, 2018.70

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

FIGURA 1 – Mapa do bioma Cerrado (WWF-Brasil, 2015)	4
FIGURA 2 – Mapa demonstrativo dos tipos de vegetação do bioma Cerrado (WWF-Brasil, 2015).....	5
FIGURA 3 – Distribuição geográfica do barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) no Cerrado Fonte: Nabout et al. (2010).....	10
FIGURA 4 – Árvore adulta de barueiro, com copa densa e arredondada, de ocorrência natural no Cerrado Goiano (A); Tronco de barueiro (B). Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....	12
FIGURA 5 – Folha alterna e composta de barueiro contendo folíolos subopostos (A); Inflorescência de barueiro do tipo panícula (B). Flores de barueiro (C e D). Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....	13
Figura 6 – Frutos (A); Aspecto geral do fruto cortado (B); Semente intacta de barueiro (C). Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.	14

Capítulo 2

FIGURA 1 – Distribuição espacial da área de ocorrência natural das matrizes selecionadas de barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) no Cerrado do Estado de Goiás. Fonte: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....	40
FIGURA 2 – Matrizes selecionadas de barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog.), de ocorrência natural no Cerrado Goiano, para a caracterização biométrica. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....	41
FIGURA 3 – Frutos enumerados das matrizes selecionadas de barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) para a caracterização biométrica. Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutai-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.	42
FIGURA 4 – Extração da semente de barueiro (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) realizada manualmente (A). Semente intacta de <i>D. alata</i> , após extração (B). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutai-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....	42
FIGURA 5 – Determinação da massa do fruto (A); da massa da semente (B) em balança digital de precisão; do diâmetro longitudinal (C) e transversal (D) do fruto e do diâmetro longitudinal (E) e transversal (F) da semente de <i>Dipteryx alata</i> Vog., com	

auxílio de paquímetro digital. Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....43

FIGURA 6 – Frascos contendo sementes de *D. alata* mantidos em semiluz (A) e luz direta (B) em sala de crescimento. Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018. 44

FIGURA 7 – Plântulas de *D. alata* *in vitro* (A); Retirada da plântula do frasco (B); Panorama de uma plântula de *D. alata* cultivada *in vitro* (C). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....45

FIGURA 8 – Determinação do comprimento da parte aérea (A), comprimento de raiz (B) e diâmetro do caule da plântula de *D. alata* cultivada *in vitro* (C). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....45

FIGURA 9 – Dados das características físicas para altura de planta, diâmetro de copa e circunferência de caule à altura do peito (CAP) (m) de dez matrizes de *D. alata* de ocorrência natural do Cerrado goiano coletadas no município de Pires do Rio em Outubro de 2017. Urutaí-GO, 2018.....47

FIGURA 10 – Valores de média, máximo e mínimo das características físicas para altura de planta, diâmetro de copa e circunferência de caule à altura do peito (CAP) (m) de dez matrizes de *D. alata* de ocorrência natural do Cerrado goiano coletadas no município de Pires do Rio em Outubro de 2017. Urutaí-GO, 2018. 48

FIGURA 11 – Valores médios para os dados biométricos de massa total de fruto (MTF) (g); diâmetro longitudinal de fruto (DLF) e diâmetro transversal de fruto (DLF) (mm) de dez matrizes de barueiro de ocorrência natural do Cerrado Goiano coletados no município de Pires do Rio - GO. Urutaí-GO, 201849

FIGURA 12 – Valores médios para as características biométricas quanto à massa total de sementes (MTS) (g); diâmetro longitudinal de semente (DLS) e diâmetro longitudinal de semente (DLS) (mm) de dez matrizes de barueiro do Cerrado goiano coletados no município de Pires do Rio - GO. Urutaí-GO, 2018. 50

FIGURA 13 – Germinação *in vitro* de 10 matrizes de barueiro (*D. alata*) (A); Semente de barueiro apresentando protrusão radicular (B) aos 5 dias após inoculação (DAI). Laboratório de Biotecnologia Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.....51

FIGURA 14 – Plântula de Barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) cultivada *in vitro* (A); Plântula em pleno desenvolvimento apresentando cotilédones abertos, raiz primária e raízes secundárias finas e parte aérea em formação (B) e plântula com tamanho diferenciado (C) aos 35 dias de cultivo. Laboratório de Biotecnologia Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018. 52

FIGURA 15 – Descrição da morfologia externa da plântula de barueiro cultivada *in vitro*. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018 53

FIGURA 16 – Biometria de plântulas *in vitro* de barueiro quanto aos valores de média, máximo e mínimo para os dados biométricos de comprimento aéreo (cm); comprimento de raiz (cm) e número de folíolos de dez matrizes de barueiro aos 35 dias de cultivo *in vitro*. Urutaí-GO, 2018.....53

FIGURA 17 – Valores médios para as características biométricas de plântulas quanto ao comprimento aéreo (cm); comprimento de raiz (cm) e número de folíolos de dez matrizes de barueiro aos 35 dias de cultivo *in vitro*. Urutaí-GO, 2018.....54

FIGURA 18 – Rede de correlação fenotípica do barueiro. Linhas verdes representam correlações positivas e as linhas vermelhas representam as correlações negativas. A largura da linha é proporcional à força da correlação. (MTF) Massa total do fruto, (MTS) Massa total da semente, (DTF) Diâmetro transversal do fruto, (DTS) Diâmetro transversal da semente; (DLF) Diâmetro lateral do fruto; (DLS) Diâmetro lateral da semente; (CA) Comprimento aéreo; (NF) Número de folíolos; (DC) Diâmetro do caule; (CR) Comprimento radicular. Urutaí-GO, 2018..... 57

FIGURA 19 – Biplot com as variáveis canônicas (Can1 e 2) contendo scores médios de 10 matrizes de barueiro com 9 variáveis avaliativas. (MTF) Massa total do fruto, (MTS) Massa total da semente, (DTF) Diâmetro transversal do fruto, (DTS) Diâmetro transversal da semente; (DLF) Diâmetro longitudinal do fruto; (DLS) Diâmetro longitudinal da semente; (CA) Comprimento aéreo; (NF) Número de folíolos; (DC) Diâmetro do caule; (CR) Comprimento radicular. Urutaí-GO, 2018..... 59

Capítulo 3

FIGURA 1 – Plântula padrão de barueiro para retirada do explante (A); Explante de segmento nodal de barueiro (B); Inoculação de segmento nodal de barueiro em frasco com meio de cultura (C). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula. 68

FIGURA 02 – Broto após 35 dias de retomada de crescimento para caracterização biométrica (A); Broto desenvolvido (B); Determinação da massa fresca (C) e comprimento de broto (D) de segmento nodal de barueiro, após a retomada de crescimento, sob diferentes doses de BAP. Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula. 71

FIGURA 3 – Sobrevida de explantes de baru na conservação *in vitro* sob temperatura de 18°C (A) e 20°C (B). M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L⁻¹. Urutaí-GO, 2018..... 74

FIGURA 4 – Número de brotos após 120 dias de conservação *in vitro* de barueiro por crescimento lento. Urutaí-GO, 2018..... 75

FIGURA 5 – Explantes de segmento nodal de barueiro em diferentes fases de desenvolvimento *in vitro* sob temperatura de 18°C e diferentes concentrações de manitol, sob regime de crescimento lento (A, B, C). Laboratório de Biotecnologia.

Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula.....	75
FIGURA 6 – Número de brotos em relação aos tratamentos no decorrer dos 30 (A) e 45 (B) de conservação <i>in vitro</i> de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L ⁻¹ . Urutaí-GO, 2018	77
FIGURA 7 – Número de brotos quanto aos tratamentos no decorrer dos 60 (A) e 90 (B) de conservação <i>in vitro</i> de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L ⁻¹ . Urutaí-GO, 2018	78
FIGURA 8 – Número de brotos em relação aos tratamentos aos 120 dias de conservação <i>in vitro</i> de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L ⁻¹ . Urutaí-GO, 2018.	79
FIGURA 9 – Brotos desenvolvidos a partir de segmento nodal de barueiro conservados <i>in vitro</i> sob temperatura de 20°C e diferentes concentrações de sorbitol, sob regime de crescimento lento (A, B). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula.	80
FIGURA 10 – Número de folíolos após 120 dias de conservação <i>in vitro</i> de barueiro por crescimento lento. Urutaí-GO, 2018.....	81
FIGURA 11 – Número de folíolos em relação aos tratamentos no decorrer dos 30 (A) e 45 (B) de conservação <i>in vitro</i> de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L ⁻¹ . Urutaí-GO, 2018.	82
FIGURA 12 – Número de folíolos em relação aos tratamentos no decorrer dos 60 (A) e 90 (B) dias de conservação <i>in vitro</i> de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L ⁻¹ . Urutaí-GO, 2018.	83
FIGURA 13 – Número de folíolos em relação aos tratamentos no decorrer dos 120 dias de conservação <i>in vitro</i> de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L ⁻¹ . Urutaí-GO, 2018.....	84

RESUMO

PAULA, MARIANA SILVA PEREIRA DE. **Caracterização biométrica, cultivo e conservação *in vitro* de barueiro de ocorrência natural do Cerrado goiano.** 2018. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

O barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) é uma frutífera nativa de grande destaque em meio à flora do Cerrado brasileiro e vem apresentando boas perspectivas de cultivo e comercialização. Assim, estabelecer o estudo de parâmetros biométricos de plantas, frutos, sementes e de cultivo *in vitro* de barueiro é interessante para se entender os padrões que determinam o comportamento dessa espécie e, ao mesmo tempo, estabelecer metodologias para a sua conservação *in vitro*. Com isso, objetivou-se com este trabalho realizar a caracterização biométrica de matrizes, frutos e sementes, além de estudar e determinar o padrão de plântulas no cultivo *in vitro* e desenvolver um protocolo para a conservação *in vitro* de barueiro. Primeiramente, foram selecionadas 10 matrizes de barueiro, de ocorrência natural do Cerrado goiano, e foi realizada a caracterização e coleta de seus frutos para a realização dos experimentos conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Federal Goiano – Campus Urutai/GO. As sementes das matrizes de barueiro foram inoculadas *in vitro* em meio de cultura e aos 35 dias de cultivo foram realizadas avaliações das características biométricas das plântulas *in vitro* quanto ao número de folíolos, ao comprimento de parte aérea, ao comprimento de raiz e diâmetro do caule. Para a realização da conservação *in vitro* por regime de crescimento lento, explantes de segmentos nodais foram inoculados em meio MS 50% suplementado com 1,0 g L⁻¹ de benzalaminopurina (BAP) e acrescido de diferentes concentrações de manitol e sorbitol em diferentes condições de temperatura (18°C e 20°C). As avaliações se basearam no número de brotos e de folíolos desenvolvidos. Aos 120 dias após conservação, foi realizada a retomada de crescimento com a utilização de diferentes concentrações de BAP. Através dos resultados obtidos, conclui-se que as matrizes se apresentaram diferenciadas quanto às características biométricas avaliadas e promissoras quanto ao cultivo *in vitro*. Em relação à conservação *in vitro*, a temperatura de 18°C e o agente osmótico manitol a 20 g L⁻¹ se destacaram mostrando crescimento lento até 120 dias de armazenamento. O BAP não promove incremento na retomada de crescimento *in vitro* de barueiro. Contudo, ressalta-se que este foi um dos trabalhos pioneiros no que se refere à conservação *in vitro* de barueiro e novos estudos devem ser realizados para se determinar ainda mais as melhores condições de conservação com o uso de baixas temperaturas e reguladores osmóticos ao meio de cultura.

Palavras-chave: cultura de tecidos, biometria, reguladores osmóticos, temperatura.

¹ Comitê Orientador: José Magno Queiroz Luz – UFU (Orientador) e Muza do Carmo Vieira

ABSTRACT

PAULA, MARIANA SILVA PEREIRA DE. **Biometric characterization, cultivation and *in vitro* conservation of barueiro of natural occurrence of Cerrado of Goiás.** 2018. 93p. Dissertation (Masters in Agronomy/Phytotechny) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

The barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) is a native fruit of great prominence in the midst of the flora of the Brazilian Cerrado and has presented good prospects of cultivation and commercialization. Thus, to establish the biometric parameters of plants, fruits, seeds and *in vitro* culture of barueiro is interesting to understand the patterns that determine the behavior of this species and at the same time to establish methodologies for its *in vitro* conservation. The objective of this work was to perform the biometric characterization of mother plant, fruits and seeds, besides studying and determining the seedling pattern in *in vitro* culture and to develop a protocol for the *in vitro* conservation of barueiro. First, 10 mother plants of barueiro of natural occurrence of the Cerrado of Goiás were selected and the characterization and collection of their fruits were carried out to performe the experiments conducted at the Biotechnology Laboratory of the Federal Institute of Goiás - Campus Urutai/GO. The seeds of the mother plants of barueiros were inoculated *in vitro* in culture medium and at 35 days of cultivation, the biometric characteristics of the seedlings were evaluated *in vitro* in relation to the number of leaflets, shoot length, root length and stem diameter. For *in vitro* conservation by slow growing regime, nodal segment explants were inoculated in 50% MS supplemented with 1.0 g L⁻¹ of benzylaminopurine (BAP) and added with different concentrations of mannitol and sorbitol at different temperature conditions (18°C and 20°C). The evaluations were based on the number of shoots and leaflets developed. At 120 days after storage, growth resumption was performed using different concentrations of BAP. Through the obtained results, it was concluded that the matrices were differentiated regarding the biometric characteristics evaluated and promising for the *in vitro* culture. In relation to *in vitro* preservation, the temperature of 18°C and the osmotic agent mannitol at 20 g L⁻¹ stood out, showing slow growth up to 120 days of storage. The BAP does not promote an increase in the *in vitro* growth of barueiro. However, it is noteworthy that this was one of the pioneer works regarding the *in vitro* conservation of barueiro and new studies must be carried out to further determine the best conservation conditions with the use of low temperatures and osmotic regulators in the medium of culture.

Keywords: tissue culture, biometry, osmotic regulators, temperature.

¹ Guidance Committee: José Magno Queiroz Luz – UFU (Major Professor) and Muza do Carmo Vieira – IFGoiânia – Campus Urutai.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Cerrado possui uma ampla diversidade de plantas nativas com potencial promissor para introdução ao cultivo, cuja variabilidade está cada vez mais ameaçada por sua ocupação e com a expansão da fronteira agrícola e o extrativismo predatório. Essa situação pode levar à extinção de muitas espécies, antes mesmo do estudo e conhecimento do seu potencial econômico (PEIXOTO et al., 2005).

Dentre as espécies nativas do Cerrado, o barueiro (*Dipteryx alata* Vogel) vem apresentando boas perspectivas de cultivo e comercialização. Essa frutífera é muito valorizada pelo seu potencial de utilização no âmbito alimentício, medicinal, industrial, silvicultural, silvipastoril, paisagístico e no reflorestamento de áreas degradadas, sendo de grande importância social, econômica e ecológica nas regiões do Cerrado (CARVALHO, 2003; SANO et al., 2004; MORENO et al., 2007).

De acordo com Martinelli e Moraes (2013), *D. alata* é uma das espécies que se encontra na lista do Livro Vermelho com declínio verificado ou projetado de extinção no bioma Cerrado. Sabendo dessa importância socioeconômica que o barueiro apresenta, torna-se necessário desenvolver técnicas que viabilizem o processo de produção de mudas, uma vez que as informações sobre essa espécie ainda são incipientes. Os poucos relatos acerca da micropropagação de barueiro são com germinação de sementes *in vitro* (MAMEDES; ARAÚJO, 2010; SILVA; 2012; PINHAL, 2012; SILVA et al., 2016a).

Cada espécie possui um padrão de desenvolvimento estabelecido e comandado pelo seu patrimônio genético (genótipo). No entanto, o complexo ambiental atua sobremaneira sobre as tendências colocadas em ação, modificando-as em vários sentidos. O fenótipo é o produto final da interação genótipo-ambiente. Em condições ambientais favoráveis prevalece o crescimento, já a diferenciação prevalece quando as condições se tornam subótimas para o crescimento (RIZZINI, 1997).

Nesse sentido, estudos relacionados à caracterização do fenótipo, ou estudos biométricos de plantas, bem como aqueles que envolvam o seu desenvolvimento são necessários para que se obter mais informações sobre espécies ainda pouco estudadas e não domesticadas. Assim, estabelecer o estudo de parâmetros biométricos de plantas, frutos, sementes e de cultivo *in vitro* de espécies nativas é interessante para se entender

os padrões que determinam o comportamento dessas plantas e, ao mesmo tempo, estabelecer metodologias para a conservação *in vitro* de frutíferas e em especial do barueiro.

A conservação *in situ* das espécies nativas está comprometida pelos modelos de manejo adotados na exploração dos recursos naturais (BASSINI, 2008), dessa forma, a domesticação associada às técnicas de cultivo *in vitro* podem representar ferramentas de grande potencial para sanar esse problema (SILVA et al., 2016a). Esse fato justifica a necessidade do desenvolvimento de métodos de conservação *in vitro*.

As técnicas tradicionais de preservação são complementadas por métodos da cultura de tecidos através da conservação *in vitro*. Isso permite a manutenção de um grande número de acessos em pequeno espaço físico, livre dos riscos existentes em campo, reduzindo os custos de manutenção e garantindo a fidelidade genética (LÉDO et al., 2014).

Para o sucesso da conservação *in vitro* é fundamental o ajuste de metodologias de conservação para as espécies vegetais e em especial para as frutíferas nativas do Cerrado. Dentre as metodologias disponíveis, a técnica de crescimento mínimo se destaca por ser considerada a de menor custo se comparada a demais técnicas, é também a de mais fácil ajuste às espécies consideradas ainda selvagens e a que menos ocasiona instabilidade genética nas espécies em cultivo.

Tendo isso em vista, o objetivo deste estudo é realizar a caracterização biométrica de plantas, frutos, sementes, estudar e determinar o padrão de plântulas no cultivo *in vitro* e desenvolver um protocolo para a conservação *in vitro* de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.). Nessa mesma lógica, propõe-se aprimorar o processo de micropropagação *in vitro*, para servir de base à produção em larga escala de mudas, além de contribuir com a ampliação dos conhecimentos para que se possa produzir sem agredir ou depauperar o bioma Cerrado e, assim, possibilitar a manutenção dessa espécie nativa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O BIOMA CERRADO

2.1.1. Aspectos Gerais

O Cerrado é considerado um dos *hotspots* mundiais, sendo uma das áreas prioritárias para a conservação, devido à sua riqueza em diversidade biológica e ao elevado grau de ameaça em que se encontra. É o segundo maior Bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km² e equivalendo a 22% do território nacional. A sua área contínua (Figura 1) incide sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal (SILVA et al., 2001; ROQUE, 2006; RIBEIRO; WALTER, 2008; BRASIL, 2016).



FIGURA 1 – Mapa do bioma Cerrado (WWF-Brasil, 2015).

No Cerrado nasce grande parte das águas que alimenta as três maiores bacias hidrográficas da América do Sul: Bacia do São Francisco – formada pelo Rio São Francisco, que nasce em Minas Gerais, na Serra da Canastra; Bacia do Amazonas – formada pelos rios Tocantins e Araguaia e Bacia do Prata – formada pelo Rio Paranaíba, o que resulta em um elevado potencial aquífero e favorece a sua biodiversidade (CAETANO, 2002; BRASIL, 2016).

Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado brasileiro detém 5% da biodiversidade do planeta, sendo reconhecido como a savana mais rica do mundo, com rica flora, contabilizando 4.400 endêmicas (exclusivas) dessa área e abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas. Mais de 220 espécies têm uso medicinal e mais 416 podem ser usadas na recuperação de solos degradados, como barreiras contra o vento, proteção contra a erosão ou para criar habitat de predadores naturais de pragas (BRASIL, 2016).

Segundo Ribeiro e Walter (2008), o Cerrado é um complexo de biomas distribuídos em um grande mosaico de vários tipos de vegetação (Figura 2), desde fisionomias campestres (Campo Sujo, Campo Limpo e Campo Rupestre), savânicas (Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda) e até florestais (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão).



FIGURA 2 – Mapa demonstrativo dos tipos de vegetação do bioma Cerrado (WWF-Brasil, 2015).

Em estudos, Oliveira-Filho e Ratter (2002) citam que vários fatores ambientais podem influenciar na distribuição fitofisionômica e florística do Cerrado, compreendendo desde o regime de fogo, o clima, o tipo de solo (fertilidade e drenagem), o relevo, as flutuações climáticas e até os distúrbios antrópicos.

O relevo encontrado na região do Cerrado pode variar de plano a suavemente ondulado, com inclinações leves, geralmente menores que 3%. Apenas 5,5% da área do Cerrado estão em altitudes acima de 900 m, a proporção maior do relevo, cerca de 50%, encontra-se em altitudes que variam entre 300 m e 600 m (ALHO; MARTINS, 1995).

Uma das características marcantes desse bioma é a sua sazonalidade, sendo regido por um período chuvoso, que dura de outubro a março, e por um período seco, que dura de abril a setembro. A precipitação média anual no bioma é de 1500 mm e a

temperatura média anual em torno de 22°C a 27°C. As máximas absolutas mensais não variam muito ao longo dos meses do ano, podendo chegar a mais de 40°C (KLINK; MACHADO, 2005; SILVA et al., 2008).

Os solos do Cerrado são profundos, bem drenados, com predominância de Latossolos em 46% da área. Esses geralmente são ricos em argila, de baixa fertilidade e com alta concentração de ferro e alumínio, o que os torna extremamente ácidos. A capacidade de troca de cátions é extremamente baixa, tanto na camada arável, como nas camadas sub-superficiais; a toxidez de alumínio nas camadas abaixo da camada arável, associada a baixos níveis de cálcio, é, certamente, o fator mais limitante para o desenvolvimento radicular das culturas, em profundidade (SILVA et al., 2001).

Para Coutinho (1992) o fogo é outro associado à estrutura da vegetação do Bioma Cerrado. Queimadas frequentes reduzem substancialmente a manutenção e renovação das árvores. As queimadas matam, ainda, os brotos terminais mais expostos. Surgem então os brotos laterais, que dão continuidade ao crescimento. Assim, sucessivas queimadas provocam sucessivos rebrotamentos laterais, determinando o desenvolvimento de formas tortuosas.

A vegetação típica do Cerrado é constituída por árvores relativamente baixas (3 m a 6 m de altura), troncos tortuosos, de baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas, esparsas, disseminadas em meio a arbustos, subarbustos e uma vegetação baixa constituída, em geral, por gramíneas. Apresenta plantas que possuem raízes profundas e, com isso, desenvolveram capacidade de buscar água no subsolo; assim, mesmo nos meses mais secos, estão com suas raízes em camadas de solo sempre úmidas; já nas gramíneas, que são constituídas de sistema radicular superficial, a parte aérea nesta época seca completamente (FERRI, 1977).

Os argumentos de Pinheiro e Monteiro (2010), no entanto, sugerem que tanto a morfologia quanto as características fisionômicas e florísticas que definem o Cerrado têm sido resultado de eventos climáticos que começaram a ocorrer no final do Terciário e com pico durante o Quaternário, somando-se a um extenso processo de seleção exercida pelos solos distróficos e fogo, típicos da seca ambiente que predominou na região Neotropical no passado.

Sabe-se que o Cerrado se manteve quase inalterado, até a década de 1950. Com a interiorização da capital nacional, a partir dessa década, grandes extensões de terra deram lugar à pecuária e à agricultura extensiva, como de soja e arroz. Tais mudanças ocorreram pela implantação de infraestrutura, viária e energética, e também pela

descoberta de novas vocações para os solos regionais, permitindo atividades agrárias rentáveis. A partir das décadas de 1970 e 1980, segundo Alho & Martins (1995) houve rápido deslocamento da fronteira agrícola, com base em desmatamentos, queimadas, uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, que resultaram em 67% de áreas do Cerrado “altamente modificadas”. Na atualidade, devido às condições privilegiadas de topografia, do solo, a região do Cerrado é a principal produtora de grãos e gado de corte do Brasil.

A pecuária extensiva ocupa mais de 65% das áreas disponíveis para as práticas agrícolas no Cerrado, caracterizando-se como uma atividade de baixa tecnologia e produtividade, e que exige grandes extensões de terra. De forma análoga, a agricultura também é responsável pelo aumento do desmatamento, na medida em que fatores como a grande disponibilidade de terras, topografia plana e suavemente ondulada e o desenvolvimento de técnicas para a correção do solo, possibilitaram o avanço da fronteira agrícola sobre o Cerrado de forma acelerada (QUEIROZ, 2004).

O rápido avanço da agropecuária sobre o Cerrado, principalmente na década de 1960 em diante, reduziu significativamente a quantidade de áreas nativas, ocasionando consequentemente a redução da quantidade de fruteiras. Assim, torna-se cada vez mais difícil ter acesso aos frutos nativos e escassez dos seus sabores gradativamente se faz presente (CONSEA, 2004).

Segundo Silva et al. (2001), Peixoto et al. (2005) e Cunha et al. (2008), apesar de toda a diversidade que possui, o Cerrado é um dos biomas mais ameaçados do país. A forma de ocupação do Cerrado, apoiada no modelo agrícola vigente, vem contribuindo de forma significativa para a descaracterização e degradação destas áreas e colocando em risco de extinção inúmeras espécies. Estima-se que 20% das espécies nativas e endêmicas presentes no Bioma Cerrado já não ocorrem em áreas protegidas, devido à rápida expansão da fronteira agrícola e ao extrativismo predatório, o que pode levar à extinção antes mesmo do estudo e conhecimento do potencial econômico de muitas espécies, principalmente das frutíferas nativas.

2.2. FRUTÍFERAS NATIVAS DO CERRADO

A produção de espécies frutíferas do Cerrado tem tido destaque econômico nos últimos anos, sendo responsável pela complementação da renda familiar de pequenos agricultores, principalmente. Neste contexto social, Silva; Egito (2005), os frutos do

Cerrado destacam-se por fazer parte da cultura e alimentação das populações que nele vivem.

As frutas nativas brasileiras e, especialmente as de ocorrência na região Centro-Oeste, já eram usadas pelos povos indígenas desde épocas remotas. Seus frutos desempenhavam papel fundamental na alimentação dos desbravadores e colonizadores da região, principalmente no que se refere ao elevado valor nutricional, como o fornecimento de vitaminas e de alguns minerais essenciais à saúde, além de atrativos sensoriais como a cor, sabor e aroma peculiares e intensos. Apesar disso, esses frutos ainda são pouco explorados e/ou estudados comercialmente (ALVES; FRANCO, 2003; AGOSTINI-COSTA; VIEIRA, 2008).

Mais de 10 tipos de frutos comestíveis são destaques do Bioma Cerrado, como os frutos do pequi (*Caryocar brasiliense*), buriti (*Mauritia flexuosa*), mangaba (*Hancornia speciosa*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), bacupari (*Salacia crassifolia*), cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*), araticum (*Annona crassifolia*) e as castanhas do baru (*Dipteryx alata*) (BRASIL, 2016).

Apresentando sabores *sui generis*, além de elevados teores de proteínas, vitaminas, açúcares e sais minerais, os frutos do cerrado são muito utilizados para o consumo *in natura* ou para a produção de doces, geleias, sucos, sorvetes e licores, sendo, assim, potencial para famílias que se favorecem com o ecoturismo regional, prática em crescente expansão na região Centro-Oeste (SILVA et al., 2001).

O interesse pelos frutos nativos do Cerrado tem atingido diversos segmentos da sociedade, dentre os quais se destacam agricultores, indústrias, comerciantes, instituições de pesquisa e assistência técnica, cooperativas, universidades, órgãos de saúde e de alimentação, entre outros (GUIMARÃES et al., 2008). Eles também já estão sendo comercializados em feiras da região Centro-Oeste, nas margens das rodovias, nas centrais de abastecimento (CEASAs) e, até mesmo, em redes de hipermercados, com preços competitivos e com grande aceitação pelo consumidor (AGOSTINI-COSTA et al., 2006).

As frutas nativas, além do seu potencial nutricional, são de rara beleza, podendo e devendo ser usadas em projetos paisagísticos e de urbanização. Podem ser utilizadas com sucesso na formação de pomares domésticos e comerciais, na recuperação de áreas desmatadas ou degradadas; no plantio intercalado com florestas; no enriquecimento da flora; no plantio em parques e jardins; no plantio em áreas acidentadas, para controle de erosão, e no plantio de áreas de proteção ambiental. É uma grande riqueza de espécies

que podem ser consideradas plantas do futuro, ainda não exploradas pelas comunidades locais e por aqueles que se dedicam ao paisagismo (MOTTA, 2012).

Além dessas características, as frutas nativas são também responsáveis pela sobrevivência de inúmeras espécies animais que se alimentam delas. Animais como o lobo guará, a raposa do campo, miquinhos, quati, anta, macaco prego, cachorro do mato e inúmeras aves. Muitas espécies do Cerrado fazem parte da flora apícola (MORETI et al, 2006; VIEIRA et al, 2008) e algumas têm propriedades medicinais, tais como: antirreumática, emoliente, anticólicas, adstringentes, combatem as disenterias, anginas e aftas. (RODRIGUES; RODRIGUES, 2001; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; GUARIM NETO; MORAIS, 2003; OLIVEIRA, 2011).

Com sabores acentuados e elevados teores de fibras, vitaminas, sais minerais e antioxidantes, essas fruteiras que crescem em meio à vegetação nativa apresentam um mercado emergente e potencial a ser explorado, principalmente por agricultores inseridos em programas de agricultura familiar e agroecologia. Utilizar fruteiras nativas como fonte de fitoquímicos para uso na alimentação pode oferecer muitas oportunidades para a indústria de alimentos e alimentos funcionais (CAVALCANTE, 2010).

Os programas governamentais pouco incluem as frutíferas nativas como tema ou fonte de alimentação alternativa. Esses programas utilizam produtos de outras regiões e consequentemente induzem a um padrão de consumo de alimentos que não são produzidos localmente. É necessária a conscientização de agricultores para que se resgate e valorize o uso das fruteiras nativas na alimentação das famílias. Também, é preciso haver programas de governo que incentivem essa utilização e apoiem iniciativas para identificar e maximizar as técnicas e estratégias de manejo, beneficiamento e comercialização de frutíferas nativas que ocorrem na região (AGOSTINI-COSTA et al., 2006).

Segundo Silva et al. (2001), cem gramas de sementes de baru fornecem 617 calorias e 26% de proteína. Em 100 g de polpa de pequi, encontramos 20 mil microgramas de vitamina A e 100 g de polpa de buriti contêm 158 mg de cálcio. Diante disso, os frutos do Cerrado apresentam enorme potencial para serem inseridos na merenda escolar (conforme rege a Lei Federal nº 11.947/2009 - CONSEA, 2004) de forma *in natura*, enriquecendo a alimentação infantil, garantindo ricas fontes de vitaminas, de proteínas e de sais minerais (SOUZA; NAVES, 2016). Porém, destaca-se as dificuldades e os desafios para a incrementação dos frutos do cerrado na merenda

escolar devido à indisponibilidade desses no mercado, como mostrado por Monego et al. (2013) em estudos com baru, buriti, cagaita, jatobá, mangaba e pequi com vistas à sua inserção na alimentação escolar.

2.3. BARUEIRO

2.3.1. Origem e distribuição

O barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) é nativo do Cerrado brasileiro, de ocorrência natural nas formações florestais Cerradão e Mata, nas áreas de transição entre Cerrado e Mata Estacional ou Mata de Galeria e no Cerrado sentido restrito (SANO et al., 2004; SILVA JUNIOR, 2005). Sua distribuição é ampla no Brasil, podendo ser encontrado nos estados de Goiás, Bahia, Maranhão, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Rondônia e Tocantins (Figura 3), com registros de coleta de frutos no Estado de São Paulo (SILVA JUNIOR, 2005; RIBEIRO et al., 2006; CARRAZZA; ÁVILA, 2010).



FIGURA 3 – Distribuição geográfica do barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) no Cerrado. Fonte: Nabout et al. (2010).

A ocorrência da espécie se dá principalmente em locais com solos mais drenados, apresentando distribuição irregular na paisagem, podendo formar grandes agrupamentos (SANO et al., 2004). É mais abundante em Cerradão e Mata Semidecídua, em solos areno-argilosos (FILGUEIRAS; SILVA, 1975) de fertilidade média (solos mesotróficos), podendo ser considerada fracamente calcífila (RATTER et al., 1978). Visto a sua ampla ocorrência territorial, representa recurso natural de

importante potencial econômico para as populações tradicionais e para a sustentabilidade do Bioma Cerrado.

2.3.2. Aspectos botânicos

A espécie *Dipteryx alata* Vog. é uma leguminosa arbórea da família Leguminosae (Fabaceae), com cerca de 18.000 espécies agrupadas em três subfamílias com características florais bastante distintas: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Faboideae. Nessa última subfamília, de ampla distribuição, com aproximadamente 482 gêneros e 12.000 espécies, inclui-se o gênero *Dipteryx*. As plantas lenhosas deste grupo são mais representadas nas regiões tropicais, enquanto as herbáceas, que possuem características mais avançadas, são mais difundidas nas regiões temperadas (BARROSO, 1991).

Essa espécie possui diferentes denominações comuns de acordo com sua região geográfica, tais como: baru ou barueiro nos estados de Goiás, Tocantins, Minas Gerais e Distrito Federal, cumbaru em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Barujo e coco-feijão no Mato Grosso, emburena brava, pau cumaru, cumarurana ou fruta-de-macaco em outras regiões brasileiras (GUIMARÃES et al., 2008; LORENZI, 2008).

O barueiro (Figura 4 A) é uma árvore de grande destaque em meio à flora do Cerrado. É uma árvore de grande porte, com altura média de 15 m e pode chegar a medir 25 metros de altura, com 70 cm de diâmetro e com vida útil em torno de 60 anos. Com copa densa, variando de alongada a arredondada, apresenta crescimento rápido, sendo importante para a fixação de carbono da atmosfera. Possui tronco (Figura 4 B) com ritidoma de cor amarelada, sua casca apresenta cor cinza-claro ou creme, com estrias transversais de formato irregular descamantes, deixando reentrâncias de cor creme (SANO et al., 2004; CARRAZZA; ÁVILA, 2010).



FIGURA 4 – Árvore adulta de barueiro, com copa densa e arredondada, de ocorrência natural do Cerrado goiano (A); Tronco de barueiro (B). Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

As folhas são alternas (Figura 5 A), exceto as folhas primordiais, compostas pinadas e pecioladas. O número de folíolos é de 7 a 12, alternos ou subopostos, subsésseis ou com pecíolo de até 2 mm de comprimento. O limbo é oblongo ou raramente suborbicular, com 4 a 13 cm de comprimento e 2 a 6,5 cm de largura, cartáceo, com diminutas pontuações translúcidas; ápice obtuso a abrupto-acuminado; base desigual arredondada, truncada ou subcordada; nervura mediana plana na fase ventral; nervuras secundárias numerosas, ascendentes, igualmente salientes nas duas faces (ALMEIDA et al., 1998; SILVA-JÚNIOR, 2005).

A espécie *D. alata* é alógama e autocompatível, porém apresentam mecanismos para evitar ou reduzir a autopolinização espontânea como a presença de película estigmática que impede a germinação do pólen (OLIVEIRA; SIGRIST, 2008).

A inflorescência do tipo panícula (Figura 5 B) é formada na parte terminal dos ramos e nas axilas das folhas superiores, bracteada, com cerca de 200 a 1000 flores; brácteas valvares com pontuações translúcidas, caducas antes de antese. As flores (Figura 5 C, D) são hermafroditas com aproximadamente 0,8 cm de comprimento, curtopedicoladas; cálice petaloide, alvo, com três dentes diminutos e dois maiores, oblongos, ciliados, simulando um vexilo, com mancha carmim; corola papilionácea, alva; vexilo suborbicular, emarginado; alas e carenas livres, longo-unguiculadas, elípticas; com 10 estames subiguais, monadelphos; anteras rimosas, ovais. O ovário é

súpero, unilocular, breve-estipitado, linear, com um só óvulo parietal inserido próximo ao ápice (ALMEIDA et al., 1998).



FIGURA 5 – Folha alterna e composta de barueiro contendo folíolos subopostos (A); Inflorescência de barueiro do tipo panícula (B). Flores de barueiro (C e D). Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

O fruto é do tipo drupa (Figura 6 A), ovoide, possui cerca de 4 a 5 cm de comprimento, é levemente achatado, com cálice persistente, marrom-claro. Possui cerca de 3 a 6 cm de comprimento e de 1,5 a 4,5 cm de largura e massa de 14 a 43 g. O endocarpo é lenhoso, de cor mais escura que o mesocarpo fibroso. Apenas uma única semente é obtida por fruto, com cerca de 2 a 2,5 cm de comprimento, representando apenas 5% da massa em relação ao fruto (SANO et al., 2004; PIMENTEL, 2008).

A semente elipsoide (Figura 6 B, C) apresenta dimensão e massa variadas, o comprimento varia de 1 a 2,6 cm, a largura de 0,9 a 1,3 cm e a massa de 0,9 a 1,6 g. A cor brilhante do tegumento varia de marrom amarelada ou avermelhada a quase preto, algumas apresentam fissuras transversais mostrando a cor branca a creme dos cotilédones (SANO et al., 2004).

Cerca de 90% dos frutos apresentam sementes sadias. Em cada quilograma, pode-se ter em média 30 frutos ou 700 sementes de baru. A semente pesa em média 1,2 g, representando 5% em relação à massa do fruto inteiro. No entanto, o tamanho do fruto assim como a massa das sementes varia com a árvore e também com a região (SANO et al., 2004).

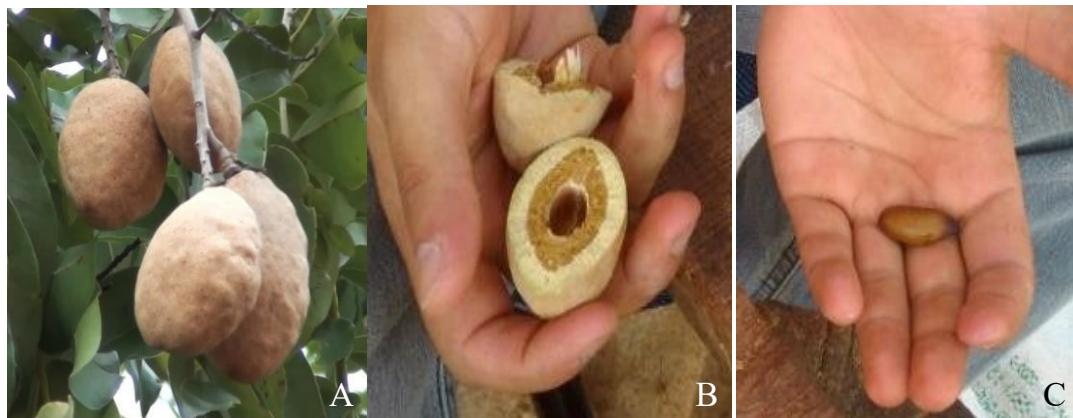


Figura 6 – Frutos (A); Aspecto geral do fruto cortado (B); Semente intacta de barueiro (C). Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

2.3.3. Aspectos ecológicos

O barueiro possui safra intermitente com variações bruscas de intensidade de produção de frutos de um ano para o outro, o clima pode ser um dos fatores inerentes. Para efeitos práticos, no que diz respeito à utilização comercial, apresenta uma safra produtiva a cada 2 anos. Uma árvore adulta produz cerca de 150 kg de fruto por safra produtiva (CARRAZZA; ÁVILA, 2010).

A espécie apresenta floração e frutificação durante a estação chuvosa e dispersão das diásporas na estação seca subsequente. Sendo assim, a floração ocorre de novembro a fevereiro e a frutificação de janeiro a março, porém dependendo da localidade pode-se encontrar frutos maduros de julho a outubro. A maturação fisiológica da semente ocorre com o início da queda dos frutos e das folhas. A renovação de folhas, quando ocorre, é tardia e durante a estação seca de julho a setembro, pode ser atribuída à restrição hídrica ou ainda a uma estratégia evolutiva para auxiliar na fuga de herbívoros (ALMEIDA et al., 1998; BULHÃO; FIGUEIREDO 2002; SILVA-JÚNIOR, 2005; PIMENTEL, 2008).

Essa frutífera apresenta frutos maduros durante a estação seca no Cerrado, sendo uma espécie importante para alimentação de aves, quirópteros, primatas e roedores nessa época. A dispersão dos frutos é barocórica (por gravidade) e também zoocórica. Neste último caso, os morcegos retiram os frutos das árvores e levam para pouso de alimentação deixando cair no caminho (MACEDO et al., 2000).

Os bovinos ingerem o fruto inteiro e eliminam o caroço, tanto sob árvores, quanto nas áreas onde permanecem para ruminar (malhador ou maromba). Já os primatas, incluindo os humanos, consomem tanto o mesocarpo como as sementes, sendo mais predadores que dispersores (SANO et al., 2004).

Outros consumidores são a arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) e roedores como a cotia (*Dasyprocta variga*). Estas espécies se alimentam das sementes e também as enterram em pontos estratégicos, enquanto cupins, formigas e pequenos besouros se alimentam do mesocarpo facilitando sua germinação (MACEDO et al., 2000).

As flores do barueiro são visitadas por muitas abelhas, entre as quais foram observadas cinco famílias, 32 gêneros e 34 espécies, sendo as mais representativas Apidae (70%) e Andrenidae (12%). A identificação do polinizador efetivo ainda não foi realizada, porém outros insetos das ordens Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera, já foram encontrados, sendo talvez importantes polinizadores, pois o fato de visitarem as flores acaba promovendo o fluxo de pólen entre os indivíduos (OLIVEIRA; SIGRIST, 2008; PIMENTEL, 2008).

Em várias locais da região do Cerrado, os barueiros adultos da vegetação nativa original são mantidos na pastagem, devido à sua importância para sombra e alimentação para o gado ou por ser uma árvore de madeira dura. O estudo de Brito (2004) nas pastagens em Pirenópolis, GO, mostrou que muitas plantas jovens ocorrem próximas à árvore-mãe até o final da estação chuvosa, mas não foram observados indivíduos jovens no final da estação seca. A causa da mortalidade das plântulas pode ser devido ao consumo das folhagens ou pisoteio pelo gado, ou também pelo manejo adotado, de roçar os arbustos da pastagem.

2.3.4. Potencial socioeconômico

A demanda por produtos oriundos de espécies nativas e de sabor exótico é crescente tanto no mercado interno quanto externo e a espécie *D. alata* vem apresentando vastas qualidades, devido a uma gama de aplicações dos seus produtos, para a comercialização.

O óleo da amêndoia de baru contém cerca de 80% de ácidos graxos insaturados, apresenta predominância dos ácidos graxos oleicos (ômega-9) e linoleicos (ômega-6) (VERA; SOUZA, 2009; FREITAS; NAVES, 2010). Em índices de saponificação e de iodo, esse óleo se assemelha ao óleo de amendoim e do azeite de oliva. Os teores de lipídeos (45%) e de proteínas (29,6%) contribuem para o valor energético de aproximadamente 500 kcal/100g. Esse óleo é muito utilizado na indústria farmacêutica, empregado como antirreumático e apresenta propriedades sudoríferas, tónicas e

reguladoras da menstruação, sendo também usado em tabacaria como aromatizante do fumo e na produção de biodiesel (TAKEMOTO et al., 2001).

Por ser uma árvore de copa larga, de folhagem verde-escura a verde-clara, fornece boa sombra durante a primeira metade da estação seca, mas é brevemente caducifólia no final dessa estação, pode ser usada no paisagismo, com bom crescimento, baixa exigência de adubação e de manutenção. Por sua alta produção de massa foliar, essa espécie é indicada para a recuperação de áreas degradadas (SANO et al., 2004).

Na alimentação, tanto a polpa (mesocarpo) quanto a amêndoas (semente) de baru são utilizadas. A polpa abriga uma amêndoas dura e comestível, chamada de castanha do baru, que representa 5% do rendimento em relação ao fruto inteiro, apesar de ser ainda pouco utilizada na alimentação humana, apresenta um valor econômico considerável (TAKEMOTO et al., 2001).

O sabor da amêndoas é agradável e menos acentuado que o do amendoim, seu valor energético é mais elevado que a polpa, de 476 a 560 kcal/100 g, na sua maioria composta de lipídios, proteínas, fibras solúveis e menor quantidade de açúcares, podendo ser consumida *in natura* ou ser usada na fabricação de produtos alimentícios, de forma torrada, como aperitivo ou em inúmeras receitas doces como pé de moleque, paçoca, rapadurinhas entre outras (SANO et al., 2004).

A casca e a polpa do baru constituem ingredientes viáveis para aplicação tecnológica na elaboração de pães integrais, bolos, licores e geleias, conferindo melhora das características nutricionais e atributos sensoriais, pois são fontes de carboidrato, proteína e óleo. A polpa apresenta valor calórico de aproximadamente 300 kcal/100 g, na sua maioria composta de carboidratos, predominantemente por amido, fibras insolúveis e açúcares (SANO et al., 2004; NEPOMUCENO, 2006; ROCHA; CARDOSO SANTIAGO, 2009).

2.3.5. Mercado

A exploração dos frutos de barueiro (*Dipteryx alata* Vog) é feita em sua maioria por agricultores familiares que complementam suas rendas com a venda das castanhas em períodos de entressafra de produtos agrícolas. No entanto, não há regularidade na comercialização do baru em razão da sazonalidade da frutificação, irregularidade das quantidades produzidas e dificuldade de estocagem do produto (FREDDO, 2013).

Segundo Soares (2015), uma forma de otimizar a produção e garantir maior rentabilidade aos extrativistas é a organização de associações ou cooperativas, como vem ocorrendo em Pirenópolis (GO) e no interior dos estados de MT e MS. Essa forma de organização garante aos extrativistas maiores rentabilidades, já que recebem apoio e orientação desde a coleta até a comercialização do produto final, passando pela quebra dos frutos e da torração.

Desde que o baru passou a constar na pauta de produtos abrangidos pela PGPM-Bio no ano/safra de 2011/2012, o preço mínimo é calculado sobre o fruto, no intuito de contemplar os extrativistas que agregam valor à produção com a quebra do fruto e posterior comercialização da amêndoia (SOARES, 2015).

O preço mínimo na safra de 2015/2016, da amêndoia de baru, foi de R\$12,05/kg, conforme Portaria nº 142 de 08/07/2015 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa, sendo o Estado de Goiás o primeiro a iniciar a pesquisa de preços ao valor de R\$ 22,25/kg, nos meses de julho e de agosto. Já em setembro, ocorreu ligeiro aumento, na ordem de 17% e o preço fechou em R\$ 26,13/kg, ou seja, valor acima do preço mínimo estipulado pelo Governo Federal, que é de R\$ 12,05/kg (SOARES, 2015).

No exercício de 2016, a Conab deu início à pesquisa de preços também nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e o preço recebido pelo produtor ficou muito acima do mínimo fixado pelo Governo Federal na safra 2015/16, passando para R\$13,22/Kg, sofrendo um reajuste em 9,7% na safra 2016/17.

De acordo com Souza et al. (2016) na região do município de Orizona, no povoado de Buritizinho, há cerca de 25 famílias envolvidas com o extrativismo do baru, sendo que muitas dessas pessoas têm nesse produto a principal fonte de renda na época da safra que vai de agosto a novembro. Segundo informações locais, existe muito baru nesta região e essa produção é quase toda comprada por atravessadores que vêm do estado de São Paulo, comprando o saco de 60 Kg do fruto com casca por, aproximadamente, R\$10,00. Sendo que, depois de extraída a amêndoia, o seu valor chega a 3,00/Kg.

Diante disso, Souza et al. (2016) ressaltam que beneficiar a amêndoia torna-se necessário para agregar mais valor ao produto e que está sendo essa uma das estratégias que a maioria dos produtores extrativistas estão adotando. Ao ensacar a amêndoia em saquinhos de 100g, obtém-se um valor de venda próximo a R\$ 5,00 e na época de pico

de safra o preço oscila entre R\$ 25,00 e R\$ 42,00 e na entressafra, R\$ 60,00, dependendo da oferta e da demanda.

2.4. CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA DE FRUTOS E SEMENTES

Quanto aos parâmetros morfológicos, nota-se que poucas espécies foram estudadas em detalhe, o que mostra a importância de trabalhos nessa área. Poucos estudos procuram observar parâmetros como o diâmetro do caule, altura da árvore, diâmetro de copa e altura de copa. Saber como as plantas nativas respondem à heterogeneidade ambiental por meio de ajuste morfológico e/ou fisiológico ao ambiente é de fundamental importância para que programas de manejo e conservação de reservas ecológicas possam ser elaborados com maior eficiência (ROCHA FILHO; LOMÔNACO, 2006).

Estudos da biometria dos frutos e sementes constituem um instrumento importante para identificar a variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie, e as relações entre essa variabilidade e os fatores ambientais podendo, dessa forma, ser utilizados em programas de melhoramento genético (CARVALHO et al., 2003).

As espécies tropicais nativas apresentam diferenças marcantes quanto ao tamanho dos frutos, número e tamanho das sementes. Entretanto, são poucos os estudos referentes à biometria de frutos e sementes das espécies menos utilizadas comercialmente e esses poderiam ampliar o conhecimento sobre elas. Segundo Cruz et al. (2001) os barueiros expressam grande variabilidade em relação ao tamanho dos frutos e número de sementes nos frutos, sendo assim, a biometria torna-se uma ferramenta importante para selecionar matrizes com maior produtividade.

A biometria da semente também está relacionada às características da dispersão e do estabelecimento de plântulas (FENNER, 1993). Durante a maturação, as sementes crescem em tamanho até atingir o valor característico para a espécie (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Dentro da mesma espécie existem, porém, variações individuais devido às influências sofridas durante o seu desenvolvimento e pela variabilidade genética existente (TURNBULL, 1975).

Embora muitas das adaptações estruturais das plantas sejam conhecidas, as informações ainda são limitadas a poucas espécies. Muitos dos aspectos da morfologia e biometria da maioria das espécies nativas são desconhecidos frente à riqueza e diversidade dessas. As informações obtidas a partir da biometria dos frutos e sementes

podem servir de base para a conservação e exploração dos recursos de valor econômico, permitindo um incremento contínuo da busca racional e uso eficaz dos frutos (GUSMÃO et al., 2006).

Outro fator relevante quanto à determinação biométrica de frutos está relacionado ao fato de constituir importante instrumento para detectar a variabilidade dentro de uma mesma população ou entre populações de uma mesma espécie, conforme verificado por Gusmão et al. (2006) e Corrêa et al. (2008).

Entretanto, estudos de procedências da deiscência em diferentes anos de colheita têm mostrado variabilidade genética na espécie e evidenciam que os frutos e sementes possuem variação anual quanto às suas características morfológicas (SANO et al., 1999, CORRÊA et al., 2008). Para Oliveira et al. (2006) o estudo de populações de espécies nativas, de acordo com as variáveis fenotípicas e genéticas, é de grande interesse, devido à intensa antropização dos sítios de ocorrência, o que levaria a uma quebra no padrão natural de fluxo gênico dessas populações.

As diferenças edafoclimáticas das áreas de colheita dos frutos, segundo Barrios e Souza Júnior (2009) podem limitar a expressão do potencial genético em algum momento durante o ciclo. Os caracteres quantitativos ou métricos sofrem grande influência do ambiente, os autores relatam que para esses caracteres é comum a presença da interação de genótipos/ambientes, que pode ser definida como o efeito diferencial dos ambientes sobre os genótipos ou a resposta diferencial dos genótipos à variação ambiental.

Para Gonçalves et al. (2013) o conhecimento da variação biométrica de caracteres de frutos e sementes é importante para o melhoramento dessas características, seja no sentido de aumentar ou uniformizar as características ou explorá-las por meio de programas de melhoramento, visando a seleção e melhoramento genético dessa fruteira para obtenção de cultivares que propiciem frutos com características importantes para a comercialização.

2.5. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS DE ESPÉCIES DO CERRADO

A cultura de tecidos é um conjunto de técnicas de propagação de espécies vegetais com notórios impactos, contudo, está em estágio inicial para as plantas nativas do Cerrado, pois ainda se encontram em estado selvagem (ALMEIDA, 2009).

A flora do Cerrado é rica em espécies e boa parte apresenta propagação seminífera dificultada, seja por heterogeneidade no processo de maturação dos frutos, ou seja por algum tipo de dormência de sementes (PINHAL et al., 2011). Muitas espécies possuem sementes recalcitrantes, o que interfere na sua viabilidade e longevidade. O Cerrado ainda enfrenta problemas com sua destruição constante por queimadas e por extrativismo predatório, o que leva a perda de material genético promissor, sendo algumas espécies até ameaçadas de extinção (LUIS, 2008).

Como a propagação da maioria das espécies florestais ocorre via semente, genótipos elite correm o risco de deixar de transmitir suas características superiores à sua descendência, quando ocorre a polinização livre. Entretanto, quando ocorre a multiplicação por autofecundação ou via propagação vegetativa este risco é quase nulo (RIBAS et al., 2005). Várias das técnicas utilizadas em cultura de tecidos vegetais são formas de propagação vegetativa realizadas em condições controladas.

Segundo Termignoni (2005), as principais aplicações da cultura de tecidos vegetais se referem à produção massal de indivíduos superiores, à preservação e conservação de germoplasma de espécies em extinção, à obtenção de plantas geneticamente transformadas e à obtenção de sistemas *in vitro* para produção de metabólitos secundários.

Algumas espécies do Cerrado já estão sendo estudadas para desenvolvimento de protocolos de técnicas de cultura de tecidos vegetais, com o intuito de minimizar os problemas de propagação das espécies, intercâmbio de material genético, conservação de germoplasma, isenção de pragas e doenças, e homogeneidade de produção (PINHAL et al., 2011).

2.5.1. Micropropagação

A propagação *in vitro*, ou micropropagação, é uma das aplicações da cultura de tecidos com maior destaque na perpetuação das espécies, quer sejam nativas ou não. É assim chamada por causa do tamanho dos explantes utilizados. Essa técnica visa à obtenção de plantas idênticas à matriz em curto período de tempo, num espaço reduzido e livre de contaminantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para se realizar a micropropagação, a escolha da planta matriz, da qual se retiram os explantes destinados à propagação *in vitro*, é uma etapa de fundamental importância. É interessante que sejam escolhidas boas matrizes, pois as demais plantas obtidas *in vitro* serão idênticas a planta mãe. É aconselhável que o material utilizado na

coleta seja previamente esterilizado ou que seja realizada uma assepsia para evitar contaminações (JUNGHANS; SOUZA, 2009).

A técnica de micropropagação engloba algumas etapas que vão do estabelecimento *in vitro*, multiplicação, enraizamento até a posterior aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007). A composição do meio nutritivo e a combinação dos reguladores de crescimento são fatores fundamentais para a produção de plantas em larga escala (SMITH, 2013). Entretanto, as respostas variam conforme a espécie, as classes, tipos e doses do regulador de crescimento utilizado (PINHAL et al., 2011).

Vários estudos têm sido realizados visando a propagação em larga escala de frutíferas do Cerrado. Martinotto et al. (2007) estudaram o efeito da escarificação e da luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). Sementes desprovidas do tegumento e sementes intactas foram inoculadas em meio MS e mantidas na ausência e presença de luz. As sementes que tiveram os tegumentos retirados apresentaram maior uniformidade e velocidade de germinação, e também tiveram um menor índice de plântulas anormais quando comparadas aos tratamentos com sementes intactas.

Lédo et al. (2007b) verificaram condições favoráveis para a germinação *in vitro* de sementes e o crescimento inicial de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Após a assepsia, as sementes de mangaba foram inoculadas em meio MS completo ou com 50% dos sais, com ou sem adição de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. Não houve diferença significativa dos tratamentos para a porcentagem de germinação. Quanto ao comprimento da raiz principal, observou-se que o meio de cultura constituído de ½ MS com 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado proporcionou maior crescimento quando comparado com os demais tratamentos.

Alguns trabalhos de micropropagação de espécies do Cerrado foram desenvolvidos utilizando reguladores de crescimento (auxinas e citocininas), com o intuito de estimular o crescimento e promover o enraizamento *in vitro*. Stein et al. (2007) estudaram os efeitos da combinação de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina – BAP (0; 0,5; 2,5; 4,5; 8,5 e 13 µM) combinadas com ácido naftalenoacético – ANA (0; 0,5, 2,5 e 5 µM) na indução de brotações em segmentos caulinares de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). A concentração de 5 µM de ANA combinada com 2,5 µM BAP, proporcionou maior crescimento das brotações e o BAP reduziu o número de brotações e o número de folhas em explantes de ingazeiro. Soares et al. (2007) observaram que concentrações de 1,0 ou

2,0 mg L⁻¹ de BAP promoveram multibrotações em segmentos nodais de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e induziram a formação de calos na base dos explantes.

Em avaliação da influência dos reguladores de crescimento BAP, AIB, ANA e AIA na propagação de gabirobeira (*Campomanesia adamantium* Camb.) Rossato et al. (2015) observaram que a utilização de meio WPM suplementado 1,0 mg L⁻¹ de BAP obteve maior indução de brotações em segmentos nodais de gabirobeira. Quanto à rizogênese, não foi possível estabelecer um protocolo eficiente, pois os resultados não foram significativos. Sousa et al. (2017) utilizaram cinco concentrações de AIB (0; 1; 2; 3; 4 mg L⁻¹) e cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45, 60 g L⁻¹) na ausência ou presença de carvão ativado (2 g L⁻¹), em meio WPM 50%, para determinar as melhores condições *in vitro* para micropopragação de caju-de árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) e observaram que o meio de cultivo suplementado com 2 g L⁻¹ de carvão, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 mg L⁻¹ de AIB foi efetivo para o estabelecimento, crescimento e enraizamento de microplantas obtidas a partir de segmentos nodais de caju-de-árvore-do-cerrado.

2.5.1.1. Meio de Cultura

Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos explantes, controlando em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Basicamente, o meio de cultura é composto por água, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, carboidratos, agentes solidificantes, reguladores vegetais e, eventualmente, aditivos como antibióticos, carvão ativado e aditivos orgânicos complexos (VILLA et al., 2009; BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2014).

Diversas formulações dos meios de cultura têm sido empregadas no cultivo *in vitro*, entre os quais estão: o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); o WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) e o B5 (GAMBORG et al., 1968) que diferem entre si basicamente em relação à concentração de sais. O meio MS é o mais utilizado na propagação *in vitro* de diversas espécies, promovendo resultados positivos na multiplicação de segmentos nodais, no desenvolvimento de embriões e na indução de embriogênese somática em explantes foliares. Entretanto, para cada tipo de explante, espécie ou cultivar, o meio de cultura mais adequado deve ser determinado experimentalmente ou baseado em literatura (LÉDO et al., 2007b; REZENDE et al., 2008; BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2014).

Segundo George et al. (2008) o sucesso da cultura de tecidos como meio de propagação vegetal é fortemente influenciado pelo meio de cultura utilizado e pelo que nele é adicionado. Um dos principais desafios da multiplicação *in vitro* baseia-se em estabelecer as melhores combinações de elementos em meio de cultura que proporcionem o crescimento e desenvolvimento adequados dos explantes (OLIVEIRA et al., 2013).

Em estudos, Araruna et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de sais (25, 50, 75 e 100%), em meios de cultivo MS e WPM, no desenvolvimento inicial de mudas de barueiro (*Dipteryx alata*) provenientes de ápice caulinar, *in vitro*. Aos 120 dias, as plântulas de *D. alata* no meio MS, em sua concentração original (100%), apresentaram melhor desenvolvimento que as em outras concentrações ou em meio WPM. Portanto, o meio MS mostrou ser o mais indicado para garantir o estabelecimento *in vitro*, uma vez que propiciou maior comprimento da raiz (27,65 cm) e número de folhas por planta (26 folhas) que o outro meio.

2.6. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

A biodiversidade tem sido cada vez mais reconhecida como um dos elementos centrais para o desenvolvimento e bem-estar da humanidade e como grande responsável pelo equilíbrio ambiental global. Embora apenas uma pequena parte de seus componentes tenha sido estudada e seus benefícios ainda não sejam totalmente conhecidos, tem-se valorizado cada vez mais sua capacidade de gerar benefícios socioeconômicos (FERRO et al., 2006).

Tendo em vista a condição brasileira de detentora da maior biodiversidade do planeta e o uso cada vez mais inadequado dos recursos naturais, surge a preocupação com a conservação dos recursos genéticos vegetais e da sua variabilidade genética, com o objetivo de preservar uma espécie de interesse. O princípio básico das tecnologias destinadas à conservação de germoplasma é a preservação máxima da diversidade genética de determinada espécie ou variedade objetivando o uso atual e futuro como fonte de variabilidade (RAZDAN, 2003; GOEDERT et al., 2007).

A cultura de tecidos surge como uma das técnicas biotecnológicas de maior êxito, visto envolver um grupo heterogêneo de técnicas que abrange métodos de propagação e conservação de germoplasma. A manutenção de coleções *in vitro* tem sido considerada como um método alternativo à conservação de germoplasma,

especialmente para espécies propagadas vegetativamente e para espécies que não podem ter suas sementes conservadas a baixa temperatura e umidade, como as da mangabeira (SANTOS et al., 2011).

Nos últimos anos, as técnicas tradicionais de preservação de germoplasma são complementadas por métodos da cultura de tecidos através da conservação *in vitro*. O que permite a manutenção de grande número de acessos em pequeno espaço físico, livre dos riscos existentes no campo, reduzindo os custos de manutenção e garantindo a fidelidade genética (LÉDO et al., 2014).

A conservação de germoplasma *in vitro* pode ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento das células, tecidos e órgãos, nas condições de crescimento lento ou pelo sistema de criopreservação, no qual há a redução na temperatura de incubação. Em ambos os sistemas, a conservação visa desacelerar ou suprimir o crescimento do material cultivado por períodos longos, entretanto, sem interferir na viabilidade e na estabilidade genética (SANTOS et al., 2011).

2.6.1. Conservação *in vitro* por crescimento lento

O crescimento lento é considerado o modo mais direto de restringir o crescimento e o desenvolvimento de plantas *in vitro*. Método este que consiste em reduzir o metabolismo vegetal por alterações no ambiente de cultivo, como, decréscimo na intensidade da luz, fotoperíodo, trocas gasosas e temperatura de incubação da cultura, e por modificações no meio de cultura, por adição de reguladores vegetais, agentes osmóticos, e redução dos componentes salinos e orgânicos, aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-se a médio ou em longo prazo, sem afetar a viabilidade genética (ARRIGONI-BLANK et al., 2014).

Silva et al. (2016) relatam que a combinação de baixas temperaturas com a adição de agentes osmóticos no meio de cultura tem sido apontada como a alternativa mais eficiente para a conservação de germoplasma *in vitro*, porém, ainda existem poucos trabalhos na literatura acerca da conservação por crescimento lento de espécies tropicais e o desempenho das plantas conservadas na fase de retomada de crescimento. Entretanto, resultados promissores para algumas espécies têm sido obtidos utilizando retardantes osmóticos, inibidores de crescimento ou alterando condições físicas como luz e temperatura (LEMOS et al., 2002, LÉDO et al., 2007a).

2.6.1.1. Agentes osmóticos

A adição de carboidratos ao meio de cultura afeta significativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*, pois esses atuam tanto como fonte de carbono e energia quanto como reguladores osmóticos do meio (FLORES et al., 2013). Osmorreguladores, tais como sacarose, sorbitol e manitol, ao serem adicionados ao meio de cultura, dependendo da concentração, agem removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento dos explantes ocorra de maneira mais lenta (SHIBLI et al., 2006), possibilitando a sua conservação por um período mais longo.

O manitol e o sorbitol são açúcares álcoois que geralmente não são metabolizados pelas plantas e por isso são utilizados na redução do potencial hídrico do meio de cultura, interferindo na absorção de água e nutrientes pelas plantas e, consequentemente, no seu desenvolvimento, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta e, assim, torna-se possível retardar a taxa de multiplicação dos explantes, aumentando o período do cultivo *in vitro* (ARRIGONI-BLANK et al., 2014). São utilizados também para proteger as membranas das baixas temperaturas e reduzir a hiperidridicidade, estado fisiológico em que a planta apresenta acúmulo anormal de água provocado pela difusão passiva da água do meio de cultivo para o interior dos tecidos ou por um distúrbio no processo metabólico da planta (KADOTA et al., 2001; FARIA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2012).

Fortes e Pereira (2001) relatam que, entre os agentes osmóticos mencionados, o manitol tem proporcionado bons resultados no que diz respeito à restrição do crescimento e do desenvolvimento de diversas espécies, por isso é frequentemente mais empregado. Sua eficácia tem sido atribuída ao fato desse carboidrato reduzir o potencial hídrico no meio de cultura e, com isso, promover um estresse osmótico causado pela diminuição na absorção de água e de nutrientes presentes no meio.

Entretanto, quando se trata do uso de agentes osmóticos, um aspecto importante a ser considerado é o fato da utilização de determinadas concentrações, pois podem ocasionar redução significativa na viabilidade e consequente deterioração após o período de armazenamento, o que pode causar toxidez, elevada oxidação ou problemas de excessivo potencial osmótico (FORTES; PEREIRA, 2001; LEMOS et al., 2002).

Sá et al. (2011) avaliaram a eficiência de regulador osmótico (manitol) nas concentrações (0, 10, 15 e 20 g L⁻¹) na conservação *in vitro* de microestacas de

mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) por crescimento lento e observou-se que na presença de manitol o comprimento da parte aérea apresentou valores numéricos inferiores à testemunha, mas, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, foi observado efeito deletério do manitol nas microestacas. Assim, o manitol nas concentrações de 10, 15 e 20g L⁻¹ não foi viável para a conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira, uma vez que apresenta efeito tóxico sobre elas.

2.6.1.2. Temperatura

A combinação de baixas temperaturas com a adição de reguladores vegetais ou agentes osmóticos no meio de cultura tem sido apontada como uma alternativa eficiente para a conservação de germoplasma *in vitro*.

O decréscimo da temperatura é uma das estratégias mais utilizadas para manter os explantes sob conservação *in vitro* por crescimento lento, por reduzir o seu metabolismo, incluindo alterações no conteúdo e ação das enzimas e na composição e funcionamento das membranas celulares (LEMOS et al., 2002; LÉDO et al., 2007a).

Para reduzir a taxa de crescimento e assim aumentar o intervalo entre os subcultivos, é necessário reduzir a temperatura da cultura entre 6 °C e 10 °C, para espécies de clima temperado, e entre 15 °C e 25 °C, para espécies de clima tropical. Isso estenderá o intervalo de subcultivo por um período entre 1 e 2 anos (BANERJEE; DE LANGHE, 1985), o que pode facilitar o manejo da coleção.

Essa técnica tem apresentado sucesso em diversas espécies. Alguns exemplos de espécies conservadas *in vitro* sob condições de baixa temperatura são: batata (*Solanum Tuberosum* L., cv. Macaca), utilizando microestacas como explantes, conservadas por 9 meses a 25 °C ± 2 °C (FORTES; PEREIRA, 2001), cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), a partir de brotos conservados por 12 meses a 15 °C (LEMOS et al., 2002); orquídea (*Vanilla* spp.), a partir de brotos, conservados por 360 dias a 2 °C (DIVAKARAN et al., 2006).

3 REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, A. T. S; VIEIRA, R. F. **Frutas nativas do Cerrado:** qualidade nutricional e sabor peculiar. Brasília: Embrapa Cerrados. 2008. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- AGOSTINI-COSTA, T. S; SILVA, D. B; VIEIRA, R. F; SANO S. M; FERREIRA, F. R.O. Espécies de maior relevância para a região centro-oeste. In: COSTA, A. T. S; SILVA, D. B; VIEIRA, R. F; SANO S. M; FERREIRA, F. R.O. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, cap. 1, p. 12-24.
- ALHO, C. J. R; MARTINS, E. S. **De grão em grão o cerrado perde espaço.** Brasília: Fundo Mundial da Natureza. WWF. PRO-CER, 1995.
- ALMEIDA, L. F. P. **Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e atemóia (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae.** 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2009.
- ALMEIDA, S. P. **Cerrado:** aproveitamento alimentar. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.
- ALVES, G. L; FRANCO, M. R. B. Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). **Journal of Chromatography A**, New York, p. 297-301, 2003.
- ARARUNA, E. C; RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P; PEREIRA, V. J; ASMAR, S. A; MELO, B. Salt concentrations in culture media for the development of *Dipteryx alata* *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 12, p. 1295-1300, 2017.
- ARRIGONI-BLANK, M. F; TAVARES, F. F; BLANK, A. F; SANTOS, M. C; MENEZES, T. S; SANTANA, A. D. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, New York, v. 1, p. 1-7, 2014.
- BANERJEE, N; DE LANGHE, E. A. L. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, Alemanha, v. 4, p. 351-354, 1985.
- BARRIOS, S. C. L; SOUZA JÚNIOR, C. L. Interação de genótipos com ambientes no melhoramento de plantas. In: SEMINÁRIOS EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, Piracicaba, 2009. **Anais...** Piracicaba: Esalq, 2009.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v. 2, 1991, p. 115-100.
- BARRUETO CID, L. P; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas.** 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2014. p. 17-45.
- BASSINI, F. **Caracterização de populações de barueiros (*Dipteryx alata* Vog. – Fabaceae) em ambientes naturais e explorados.** 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

BASTOS, L. P; MOREIRA, M. J. S; COSTA, M. A. P. C; ROCHA, M. C; HANSEN, D. S; SILVA, S. A; DANTAS, A. C. V. L; SOUSA, C. S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007.

BRITO, M. A. **Fitossociologia e ecologia de população de *Dipteryx alata* Vog. (baru) em área de transição cerrado denso/mata estacional, Pirenópolis, GO**. 2004. 127 f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

BULHÃO, C. F; FIGUEIREDO, P. S. Fenologia de leguminosas arbóreas em uma área de cerrado marginal no nordeste do Maranhão. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 361-369, 2002.

CAETANO, J. **Cerrado**: o que é, como é, como está. Goiás: Graftsafra, 2002.

CARRAZZA, L; ÁVILA, J. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Baru**. 2. ed. Brasília: Ed. Instituto Sociedade, População e Natureza, 2010. 56 p. (Série Manual Tecnológico).

CARVALHO, N. M; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003.

CAVALCANTE, T. B. Apresentação. In: VIEIRA, R. F; AGOSTINI-COSTA, T. S; SILVA, D. B; SANO, S.M; FERREIRA, F. R. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

CONSEA - CONSELHO NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL, **Princípios e Diretrizes de uma Política de Segurança Alimentar e Nutricional**. Brasília, 2004.

CORRÊA, G. C; NAVES, R. B; ROCHA, M. R; CHAVES, L. J; BORGES, J. D. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**, Uberlândia, vol. 24, n. 4, p. 42–47, 2008.

COUTINHO, L. M. O cerrado: ecologia do fogo. **Revista Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 131-136, 1992.

CRUZ, E.D; MARTINS, F. O; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e sementes e germinação de Jatobá-curuba (*Hymenaea intermédia* Ducke, Leguminosa e Caesalpinoideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 01-10, 2001.

CUNHA, N. R. S; LIMA, J. E; GOMES, M. F. M; BRAGA, M. J. A intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil. Piracicaba/SP. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 291- 323, 2008.

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

FARIA, G. A; COSTA, M. A. P. C; JUNGHANS, T. G; LEDO, C. A. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FENNER, M. **Seed ecology**. London: Chapman & Hall, 1993.

- FERRI, M. G. Ecologia dos cerrados. In: FERRI, M.G. (Ed.). **IV Simpósio sobre o Cerrado**. Brasil: Editora Universidade de São Paulo. 1977, p.15-31.
- FERRO, A. F. P; BONACELLI, M. B. M; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrentiais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, São Paulo, v.13, n.3, p.489-501, 2006.
- FILGUEIRAS, T. S; SILVA, E. Estudo preliminar do baru (Leg. Faboideae). **Brasil Florestal**, Brasília, v. 6, n. 22, p. 33-39, 1975.
- FLORES, R; ULIANA, S.C; PIMENTEL, N; GARLET, T. M. B. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199, 2013.
- FORTES, G. R. L; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetil salicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1261-4, 2001.
- FREDDO, A. R. L. F. Baru (Fruto). In: Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). **Proposta de Preços Mínimos**: safra 2013/2014: produtos da sociobiodiversidade. Brasília, 2013, p.106-132.
- FREITAS, J. B; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, Campinas vol. 23, n. 2, p.269-279, 2010.
- GAMBORG, O. L; MILLER, R. A; OJIMA, O. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GEORGE, E. F; HALL, M. A; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Springer, 2008.
- GOEDERT, C. O; WETZEL, M. M. V. S. Sistema de curadorias de germoplasma e o programa de conservação e uso de recursos genéticos do sistema Embrapa. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 25-60, 2007.
- GONÇALVES, L. G. V; ANDRADE, F. R; MARIMON JUNIOR, B. H; SCHLOSSER, T. R; LENZA, E; MARIMON, B. S. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, vol. 36, n. 1, p. 31-40, 2013.
- GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, v.1, 1998, p. 99-169.
- GUARIM NETO, G; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.
- GUIMARÃES, R; VIANNA, A. C; MACHADO, A. A; FAVARO, S. P. Caracterização química da farinha desengordurada e obtenção do concentrado proteico de amêndoas de baru (*Dipteryx alata* Vog.). In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE O CERRADO, 9, SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília, [s.n.]. 2008. (1 CD-ROM).

GUSMÃO, E; VIEIRA, F. A; FONSECA JÚNIOR, É. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Cerne**, Lavras, vol. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.

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

KADOTA, M; IMIZU, K; HIRANO, T. Doubléphase in vitro culture using sorbitol increase shoot proliferation and hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 207- 210, 2001.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 147-155, jul. 2005.

LÉDO, A. S; CUNHA, A. O; ARAGÃO, W. M; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento do coqueiro anão. **Magistra**, v. 19, p. 346-351, 2007a.

SECA, G. S. V; BRANDÃO, S. B. S. C; SILVA JÚNIOR, J. F. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007b.

MOURA, C. R. F; MACHADO, C; RAMOS, S. R. R; SILVA, A. V. C; LÉDO, C. A. S. Mannitol for coconut *ex situ* conservation by minimum growth. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 2, p. 148-151, 2014.

LEMOS, E. E. P; FERREIRA, M. S; ALENCAR, L. M. C; RAMALHO NETO, C. E; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LLOYD, G; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, v.30, p.421-426, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, v. 1. 384 p.

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

MACEDO, M; FERREIRA, A. R; DA SILVA, C. J. Estudos da dispersão de cinco espécies-chave em um capão no Pantanal de Poconé, Mato Grosso. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 3, 2000. Corumbá, **Anais...** Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA-CPAP, 2000, p. 229-229.

MAMEDES, T; ARAÚJO, S. Cultivo *in vitro* de explantes de *Dipteryx alata*. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8, 2010, Anápolis, GO. **Anais eletrônicos...** Anápolis: SIC, 2010. Disponível em: <http://www.prp2.ueg.br/sic2010/apresentacao/trabalhos/html/sic/ciencias_agrarias.htm> Acesso em: 05 jan.2018.

MARTINELLI, G; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

- MARTINOTTO, C; PAIVA, R. SANTOS, B. R; SOARES, F. P; NOGUEIRA, R. C; SILVA, A. A. N. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação in vitro de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1668-1671, 2007.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, **O Bioma Cerrado**. [S.l.: s.n.]. 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 01 de jan. 2018.
- MONEGO, E. T; ALEXANDRE, V. P; SOUSA, L. M; MARTINS, K. A; ROSA, J. Q. S; SOUZA, P. L. C; ASSIS, J. N. Produção e potencial agrícolas de alimentos destinados à alimentação escolar em Goiás e no Distrito Federal, na Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 233-241, 2013.
- MORENO, M. A; TARAZI, R; DEFAVARI, G. R; FERRAZ, E. M; MORAES, M. L. T; CANUTO, D. S. O; GANDARA, F. B; CIAMPI, A.Y. & KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de *Dipteryx alata* Vog. em uma população natural do município de Campina Verde - MS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53, 2007, Águas de Lindóia. **Anais ... Águas de Lindóia**: 2007.
- MORETI, A C. C. C; ANACLETO, D. A; ÁVILA, M. d'; VIEIRA, G. H. C; MARCHINI, L. C. Abelhas visitantes em vegetação de diferentes áreas remanescentes de cerrado. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 18, n. 4, p. 229-248, 2006.
- MOTTA, R. **Frutas nativas do Brasil e Paisagismo**. 2012. Disponível em: <<https://paisagismodigital.com/Noticias/?id=frutas-nativas-do-brasil-e-paisagismo&in=282>> Acesso em: dez. de 2017.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NABOUT, J. C; SOARES, T. N; DINIZ-FILHO, J. A. F; DE MARCO JÚNIOR, P; TELLES, M. P. C; NAVES, R. V; CHAVES, L. J. Combining multiple models to predict the geographical distribution of the Baru tree (*Dipteryx alata* Vogel) in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 911-9, 2010.
- NEPOMUCENO, D. **O extrativismo de baru (*Dipteryx alata* Vog) em Pirenópolis (GO) e sua sustentabilidade**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) – Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2006.
- OLIVEIRA, A. N; SILVA, A. C; ROSADO, S. C. S; RODRIGUES, E. A. C. Variação genética entre e dentro de procedências de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 6, p. 905-909, 2006.
- OLIVEIRA, D. L. Viabilidade econômica de algumas espécies medicinais nativas do cerrado. **Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 301-332, 2011.
- OLIVEIRA, L. S; DIAS, P. C; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.
- OLIVEIRA, M. I. B.; SIGRIST, R. Fenologia reprodutiva, polinização e reprodução de *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae-Papilionoideae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 195-207, 2008.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. Vegetation physionomies and wood flora of the Cerrado Biome. In: Oliveira, P.S. & Marquis, R.J. **The Cerrados of Brazil: ecology**

and natural history of a neotropical savanna (Eds.). Columbia University Press, New York, 2002, p.91-120.

PEIXOTO, N; SILVA, E; TEIXEIRA, F. G; MOREIRA, F. M. Avaliação de crescimento inicial de populações de gabiroba em Ipameri. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1.; JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 3., 2005, Anápolis. **Anais...** Anápolis: [s.n.], 2005.

PIMENTEL, N. **Processo produtivo para o aproveitamento dos produtos florestais não madeireiros do baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

PINHAL, H. F. **Estabelecimento *in vitro* de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.)**. 2012. 54 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

PINHAL, H. F; ANASTÁCIO, M. R; CARNEIRO, P. A. P; SILVA, V. J; MORAIS, T. P; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PINHEIRO, M. H. O. A; MONTEIRO, R. B. Contribution to the discussions on the origin of the cerrado biome: Brazilian savanna. **Brazilian Journal Biological**, Brasília, v. 70, n. 1, p. 95-102, 2010.

QUEIROZ, F. A. Impactos do comércio internacional de soja sobre a biodiversidade do Cerrado. In: ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E SOCIEDADE, 2., 2004. **Anais...** Indaiatuba: ANPPAS, 2004. 21 p.

RATTER, J. A; RICHARDS, P. W; ARGENT, G; GIFFORD, D. R. Observations on the forests of some mesotrophic soils in central Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.1, p.47-58, 1978.

RAZDAN, M. K. **Introduction to plant tissue culture**. 2nd ed. Enfield: Science Publishers, 2003, p. 287-306.

REZENDE, J. C; PASQUAL, M; CARVALHO, S. P; PEREIRA, A. R; VILLA, F. V. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.

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

RIBEIRO, J. F; SANO, S. M; BRITO, M. A; VIEIRA, R. F; COSTA, T. S. A; SILVA, D. B; FERREIRA, F. R; SANO, S. M. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

RIBEIRO, J. F; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M; ALMEIDA, S. P; RIBEIRO, J. F. (Eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

RIZZINI, C T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições LTDA. 747p. 1997.

ROCHA FILHO, L. C; LOMONACO, C. Variações fenotípicas em subpopulações de *Davilla elliptica* A. St.-Hil. (Dilleniaceae) e *Byrsonima intermedia* A. Juss.

(Malpighiaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p.719-725, 2006.

ROCHA, L; CARDOSO SANTIAGO, R. Implicações nutricionais e sensoriais da polpa e casca de baru (*Dipteryx Alata vog.*) na elaboração de pães. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, 820-825, 2009.

RODRIGUES, V. E. G; RODRIGUES, D. A. C. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA. 2001.

RODRIGUES, V. E. G; CARVALHO, D. A. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

ROQUE, P. (Coord.). **A colonização do cerrado: savanas e celeiro do mundo**. São Paulo: Editora Prêmio, 2006.

ROSSATO, M; SCHUMACHER, P. V; COSTA NETTO, A. P; SOUZA, G. C; REIS, E. F; STEIN, V. C. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de gabirobeira. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 70-77, 2015.

SÁ, A. J; LÉDO, A. S; LÉDO, C. A. S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SANO, S; RIBEIRO, J; BRITO, M. **Baru: biologia e uso**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 52p. (Série Documentos).

SANO, S.M; VIVALDI, L. J; SPEHAR, C. R. Diversidade morfológica de frutos e sementes de Baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, vol. 34, n. 4, p. 513–518, 1999.

SANTOS, M. C; LÉDO, A. S; LÉDO, C. A. S; SOUZA, F. V. D; SILVA JUNIOR, J. F. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42 n. 3, 2011.

SHIBLI, R. D; SHATNAWI, M. A; SUBAIH, W. S; AJLOUNI, M. M. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World journal of agricultural sciences**, v. 2, p. 372-382, 2006.

SILVA JUNIOR, M. C. **100 árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado. 2005.

SILVA, A. K. D; EGITO, M. D. Rede de Comercialização Solidária de Agricultores Familiares e Extrativistas do Cerrado: um novo protagonismo social. **Agriculturas**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, 2005.

SILVA, D. B; SILVA, J. A; JUNQUEIRA, N. T. V; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.

SILVA, F. A. M; ASSAD, E. D; EVANGELISTA, B. A. Caracterização Climática do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M; ALMEIDA, S. P; IBEIRO, J. F. **Cerrado Ecologia e Flora**. Embrapa Cerrados - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2008. Cap. 3. p. 69-87.

SILVA, H. F. J; ASMAR, S. A; DE OLIVEIRA, R. C; DE MELO, B; LUZ, J. M. Q; PASQUAL, M. *In vitro* establishment and early development of barueiro (*Dipteryx alata* Vogel). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, p. 1779-1790, 2016a.

SILVA, N. D. G; DUTRA, L. F; BIANCHI, V. J; SOMMER, L. R; VARGAS, D. P; PETERS, J. A. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture and Micropagation**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2016b.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture**: techniques and experiments. Texas: College Station, 2013.

SOARES, F. M. S. Barú (amêndoas). In: CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura mensal** – setembro de 2015. Brasília, 2015. p.1-4. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 05 jan.2018.

SOARES, F. P; PAIVA, R; ALVARENGA, A. A; NOGUEIRA, R. C; EMRICH, E. B; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

SOUSA, I. D; SOUSA, J. B; PEREIRA, F. D; SANTANA, J. G; RUBIO NETO, A; ASSIS, E. S. Composição do meio de cultivo para produção de microplantas de caju-de-árvore-do-Cerrado (*Anacardium othonianum* RIZZ.). **Revista Científic@**, Goianésia, v. 1, n. 5, 2017.

SOUZA, E. C. M; TURINI, E. T; FREDDO, A. R. Amêndoas de baru. In: CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). **Conjuntura mensal**: agosto de 2016. Brasília, 2016, p. 1-2. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 05 jan. 2018.

SOUZA, H. A; NAVES, L. C. R. Preservação do Bioma Cerrado e o aproveitamento dos frutos nativos na merenda escolar em Goiânia no contexto da educação ambiental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, 7., 2016 Campina Grande, PB. **Anais...** Campina Grande: ConGeA, 2016. Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/congresso/congresso7.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

STEIN, V.C; PAIVA, R; RODRIGUES, M; NOGUEIRA, G; SOARES, F. P; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.723-725, 2007.

TAKEMOTO, E; OKADA, I. A; GARBELOTTI, M. L; TAVARES, M; AUED-PIMENTEL, S. 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, 113-117, 2001.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005. 182 p.

TURNBULL, J. W. Seed extraction and cleaning. In: KHAN, A. M. **Report on the FAO/DANIDA training course on forest seed collection and handling**. Proceedings Rome: FAO, 1975.

VASCONCELOS, A. G. V; TOMAS, L. F; CAMARA, T. R; WILLADINO, L. Hiperidridicidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 837- 844. 2012.

VERA, R; SOUZA, E. R. B. Baru. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2009.

VILLA, F; PASQUAL, M; ASSIS, F. A; PIO L. A. S. Sacarose e um aditivo orgânico complexo na micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Plant Cell Culture and Micropagation**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 1- 8, 2009.

WWF-Brasil – Organização Não Governamental (ONG). 2015. Disponível em: <<https://www.wwf.org.br/>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES E BIOMETRIA DE FRUTOS, SEMENTES E PLÂNTULAS GERMINADAS *in vitro* DE BARUEIRO DO CERRADO GOIANO

1 RESUMO

PAULA, MARIANA SILVA PEREIRA DE. **Caracterização de matrizes e biometria de frutos, sementes e plântulas germinadas *in vitro* de barueiro do Cerrado Goiano.** 2018. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

O barueiro é uma frutífera arbórea de grande destaque em meio à flora do Cerrado Brasileiro. Todavia, o extrativismo predatório e as monoculturas estão colocando em risco esta espécie. O estudo da caracterização de plantas em seu local de origem, a biometria de frutos e de sementes, o desenvolvimento de metodologias para cultivo *in vitro* e a caracterização de plântulas são procedimentos relevantes na busca de estratégias de conservação do patrimônio genético das frutíferas nativas do Cerrado. O objetivo desse trabalho foi caracterizar e determinar o padrão biométrico de diferentes matrizes, frutos, sementes e realizar o cultivo *in vitro* de barueiro do Cerrado goiano. No município de Pires do Rio - GO foram selecionadas 10 matrizes de barueiro de ocorrência natural e realizada a caracterização das plantas adultas e coletadas seus frutos. No Laboratório de Biotecnologia do Instituto Federal Goiano Campus Urutaí- GO, os frutos e suas sementes foram pesados e medidos. Após a assepsia, as sementes foram inoculadas *in vitro* em meio MS com metade da concentração de sais (50%), suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina e acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose e vitaminas. Aos 35 dias, após a inoculação, foram realizadas avaliações das características biométricas das plântulas *in vitro* quanto ao número de folíolos, o comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e diâmetro do caule. Foi utilizada a estatística descritiva para a obtenção de valores médios, máximos e mínimos. Realizou-se a análise de variância para verificar possíveis diferenças entre as matrizes tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo as médias das variáveis significativas comparadas pelo teste de Tukey com probabilidade de 5%. Após a realização da Anova, os dados foram submetidos à análise multivariada de correlação. As matrizes estudadas apresentaram-se diferenciadas quanto às características biométricas avaliadas. Essa espécie é promissora quanto ao cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, frutífera nativa, padrão biométrico, *Dipteryx alata* Vog..

¹ Comitê Orientador: José Magno Queiroz Luz – UFU (Orientador) e Muza do Carmo Vieira.

2 ABSTRACT

PAULA, MARIANA SILVA PEREIRA DE. **Characterization of mother plant and biometry of fruits, seeds and *in vitro* germinated seedlings of Barueiro of natural occurrence in Cerrado of Goiás.** 2018. 93p. Dissertation (Masters in Agronomy/Phytotechny) -Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

The barueiro is a fruit tree of great prominence among the flora of the Brazilian Cerrado. However, predatory extraction and monocultures are putting this species at risk. The study of characterization of plants in their place of origin, fruit and seed biometry, the development of methodologies for *in vitro* cultivation and the characterization of seedlings are relevant procedures for the search of strategies for the conservation of the genetic patrimony of the native fruits of the Cerrado. The objective of this work was to characterize and determine the biometric pattern of different mother plants, fruits, seeds and *in vitro* cultivation of barueiro in Cerrado of Goiás. In the municipality of Pires do Rio - GO were selected 10 mother plant of barueiro of natural occurrence and performed the characterization of the adult plants and collected their fruits. In the Biotechnology Laboratory of the Federal Institute of Goiás Campus Urutai -GO, the fruits and their seeds were weighed and measured. After asepsis the seeds were inoculated *in vitro* in MS with half the concentration of salts (50%), supplemented with 1.0 mg L⁻¹ benzylaminopurine and added with 15.0 g L⁻¹ of sucrose and vitamins. At 35 days after inoculation, the biometric characteristics of *in vitro* seedlings were evaluated for the number of leaflets, aerial length, root length and diameter of the stem. Descriptive statistics were used to obtain mean, maximum and minimum values. The analysis of variance was performed to verify possible differences between the mother plants both *in vivo* and *in vitro*, and the means of the significant variables were compared by the Tukey test with a probability of 5%. After the Anova, the data were submitted to multivariate correlation analysis. The mother plants studied were differentiated according to the biometric characteristics evaluated. This species is promising for *in vitro* culture.

Keywords: *in vitro* culture, native fruit, biometric pattern, *Dipteryx alata* Vog..

¹Guidance Committee: José Magno Queiroz Luz – UFU (Major Professor) and Muza do Carmo Vieira – IFGoiano – Campus Urutai.

3 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro detém 5% da biodiversidade do planeta, sendo reconhecido como a savana mais rica do mundo com uma flora bastante diversificada, mas é desvalorizado dentre os biomas brasileiros, o que pode ser percebido a partir da sua contínua degradação. Conhecer os valores e as riquezas desse bioma é essencial para que se possa preservá-lo (SOUZA; NAVES, 2016).

Dentre as riquezas encontradas no bioma Cerrado, as espécies frutíferas nativas são promissoras. Essas plantas são espécies de diversos gêneros e famílias que constituem importante fonte de alimento para os animais, produzindo frutos de interesse tanto para a alimentação “*in natura*” quanto para a industrialização. Há um mercado potencial e crescente para as frutíferas nativas, porém ainda pouco explorado pelos agricultores (JUNQUEIRA et al., 2008). É necessário o estudo dessas espécies, uma vez que o aproveitamento desses frutos nativos tem sido feito apenas de forma extrativista e, embora conhecidos, não foram até agora explorados e requerem atenção também por parte de pesquisadores (FELFILI et al., 2004; FRANZON, 2009).

Dentre essas espécies encontra-se a *Dipteryx alata* Vogel, popularmente conhecida como baru ou barueiro, cumbaru, cumaru, castanha de burro, viagra do Cerrado ou coco feijão, dependendo da região do Cerrado onde ela ocorre. O baru ou barueiro, como é conhecido na região Centro-Oeste, é uma leguminosa arbórea da família *Leguminosae* (*Fabaceae*) e subfamília *Faboideae*. É uma árvore de grande destaque em meio à flora do Cerrado, com altura média de 15 m e podendo chegar a medir 25 metros de altura, com 70 cm de diâmetro e com vida útil em torno de 60 anos (SANO et al., 2004; CARRAZZA; ÁVILA, 2010).

A concentração de esforços na conservação genética de populações naturais deve ser determinada através de estudos que quantifiquem e caracterizem a distribuição da diversidade genética (KAGEYAMA; GANDARA, 1998). É urgente a relevância de estudos sobre as espécies nativas do Cerrado, pois, o extrativismo e o desmatamento sem controle podem comprometer de maneira irreversível as fontes de recursos genéticos. As perdas de variabilidade genética causadas pela atividade humana são ocasionadas em grande parte em função da destruição de habitats naturais de populações de plantas (PAIVA et al., 1998).

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado pode contribuir para minimizar alguns problemas através da multiplicação sistematizada de plantas; intercâmbio de material genético; resgate de germoplasma e preservação de material ameaçado, além de possibilitar a redução no período de germinação de sementes, isenção de pragas e doenças e; uniformização nas plântulas obtidas (MELO, 2000).

Medidas de avaliação do conhecimento do comportamento das frutíferas nativas, em especial da espécie *D. alata*, têm sido realizadas por diversos autores no sentido de colocar à disposição dos leitores informações sobre a coleta de seus frutos para a caracterização de suas sementes (FERREIRA et al., 1998; SILVA et al., 1996; CORREIA, 1999; SANO et al., 2004; SANO et al.; 2010; MOTA, 2013; ZARUMA et al.; 2015). Trabalhos de pesquisa de cultivo *in vitro* que, analogamente aos estudos com o sistema tradicional de produção de mudas e biometria, disponibilizam e correlacionam essas caracterizações também são incipientes (FERREIRA et al., 1998; VICINI, 2005; FALEIRO et al., 2007; PINHAL et al., 2011; VENTUROLI et al., 2011; PAULA et al., 2016; BORGES et al., 2017). Dessa forma, surge a necessidade de pesquisas, das quais o Brasil ainda carece, que contemplem a caracterização em várias áreas de conhecimentos.

O estudo de biometria de plantas em seu local de origem, a caracterização de frutos e sementes, o desenvolvimento de metodologias para cultivo *in vitro* e a caracterização de plântulas são procedimentos relevantes para a busca de estratégias de conservação do patrimônio genético das frutíferas nativas do Cerrado. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi determinar o padrão biométrico de diferentes matrizes, frutos, sementes e realizar o cultivo *in vitro* de barueiro do Cerrado goiano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Prospecção, seleção e caracterização das matrizes de barueiro

O trabalho de prospecção para a identificação das matrizes de *Dipteryx alata* Vog. (barueiro) foi realizado de julho a agosto de 2016 em área de pastagem no Cerrado do Estado de Goiás, na Fazenda Baú, localizada no município de Pires do Rio - GO, na latitude 17°9'39,53" S e longitude 48°22'48,20" O, a 825 metros de altitude (Figura 1).

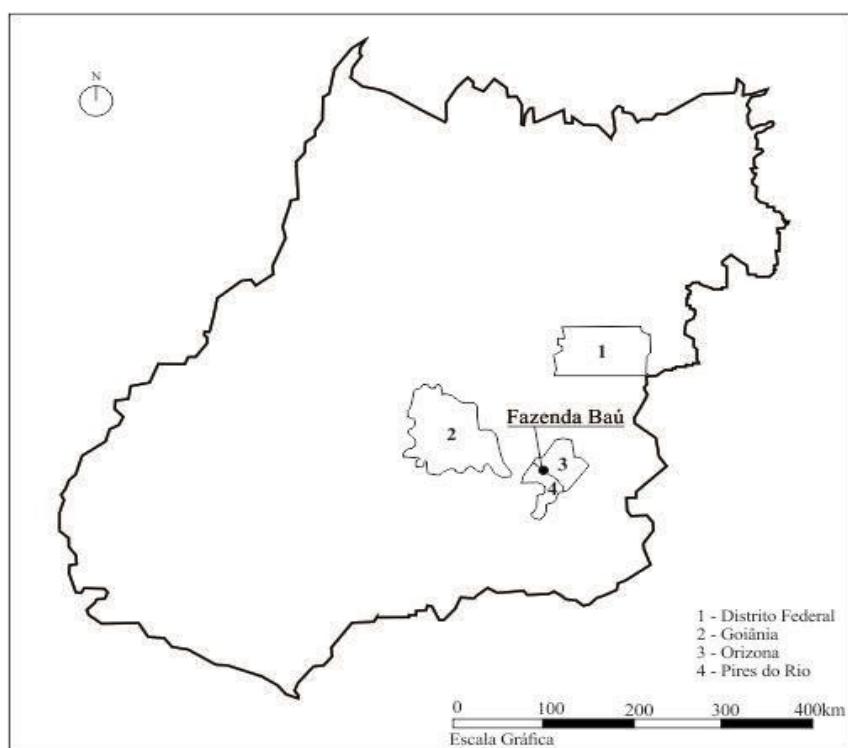


FIGURA 1 – Distribuição espacial da área de ocorrência natural das matrizes selecionadas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) no Cerrado do Estado de Goiás. Fonte: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

Foram selecionadas 10 matrizes de barueiro de ocorrência natural na área que apresentavam bom aspecto fitossanitário e produção adequada de frutos. As coordenadas geográficas e a altitude das matrizes foram determinadas utilizando aplicativo C7 GPS Dados, desenvolvido pela Universidade Federal de Ciências Rurais de Santa Maria - UFSM. As 10 matrizes selecionadas para estudo e as respectivas coordenadas geográficas e altitudes estão relacionadas na Figura 02 e Tabela 01, respectivamente.



FIGURA 2 – Matrizes selecionadas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.), de ocorrência natural no Cerrado Goiano, para a caracterização biométrica. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

TABELA 1 – Coordenadas geográficas das matrizes de barueiro, selecionadas para a realização do estudo, provenientes do Cerrado Goiano. Urutaí-GO, 2018.

Matrizes (M)	Coordenadas				Vegetação
	Latitude	Longitude	Altitude (metros)		
M 1	17° 9' 55,54" S	48° 22' 19,94" O	850		
M 2	17° 9' 54,88" S	48° 22' 19,84" O	842		
M 3	17° 9' 54,94" S	48° 22' 22,11" O	842		
M 4	17° 9' 54,55" S	48° 22' 22,26" O	858		
M 5	17° 9' 54,22" S	48° 22' 21,61" O	847		Pastagem
M 6	17° 9' 54,09" S	48° 22' 22,12" O	851		
M 7	17° 9' 54,45" S	48° 22' 22,52" O	855		
M 8	17° 9' 48,34" S	48° 22' 30,45" O	850		
M 9	17° 9' 49,49" S	48° 22' 29,88" O	836		
M 10	17° 9' 47,95" S	48° 22' 31,09" O	835		

A caracterização das matrizes em campo foi feita no mês de novembro de 2017, quando foram realizadas as avaliações das características físicas quanto à altura total da planta (ATP), obtida utilizando-se uma vara graduada, o diâmetro da copa (DC) e a circunferência do caule à altura do peito (CAP), mediante utilização de uma trena manual.

4.2. Caracterizações biométricas de frutos e sementes de barueiro

No período de agosto de 2016, nas matrizes selecionadas, foi realizada a coleta de frutos na área de projeção da copa. Coletaram-se 20 frutos de cada matriz, preferencialmente frutos recém-caídos no solo, os quais estariam no estágio de maturação completa. Esses foram acondicionados em saquinhos plásticos transparentes, mantendo-se a identificação da matriz com uma etiqueta contendo um número correspondente a cada planta coletada.

Os frutos foram transportados para o Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC), do Instituto Federal Goiano Campus Urutai-GO, e lá enumerados (Figura 3) para a realização da caracterização biométrica.



FIGURA 3 – Frutos enumerados das matrizes selecionadas de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) para a caracterização biométrica. Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutai-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

A caracterização biométrica foi realizada nos frutos e nas suas respectivas sementes, que foram obtidas através da extração manual dos frutos, após caracterização (Figura 4).



FIGURA 4 – Extração da semente de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) realizada manualmente (A). Semente intacta de *D. alata* após extração (B). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutai-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

As características avaliadas para a caracterização biométrica dos frutos e sementes das matrizes foram: massa do fruto (MTF) e da semente (MTS) em (g), o

diâmetro transversal de fruto (DTF) e de semente (DTS) e o diâmetro longitudinal de fruto (DLF) e de semente (DLS) em (mm). A MTF e a MTS foram obtidas por meio de pesagem individual em balança digital de precisão (g) (Figura 5 A, B). O DLF e o DLS foram tomados na região de inserção do pedúnculo, à parte oposta a este, e o DTF e o DTS foram perpendicular ao primeiro, com o auxílio de um paquímetro digital de precisão de 0,01 mm (Figura 5 C, D, E e F).



FIGURA 5 – Determinação da massa do fruto (A); da massa da semente (B) em balança digital de precisão; do diâmetro longitudinal (C) e transversal (D) do fruto e do diâmetro longitudinal (E) e transversal (F) da semente de *Dipteryx alata* Vog., com auxílio de paquímetro digital. Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutai-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

4.3. Germinação de sementes e caracterização biométrica de plântulas *in vitro* de barueiro

As sementes, após a caracterização biométrica, foram lavadas em água corrente e detergente e posteriormente desinfestadas pela imersão por 1 minuto em álcool 70% de pureza ($v\ v^{-1}$) sob agitação, e depois, durante 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% de cloro ativo ($v\ v^{-1}$), sob agitação constante. Ao término desse processo, em câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por três enxagues em água destilada e autoclavada.

A inoculação foi realizada em frasco de vidro (268 mL) contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais (50%), suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado – dose esta utilizada de acordo com estudos prévios realizados com a espécie *D. alata* no LABIOTEC – e 6,0 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8±2. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e plástico do tipo parafilme e autoclavados a 121°C, durante 20 minutos.

A germinação e o desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *D. alata* ocorreram em sala de crescimento, a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas. Os frascos foram mantidos por 7 dias em semiluz (parte da prateleira sem a presença de luz direta) e 28 dias em luz direta (Figuras 6 A, B), com bases em estudos prévios realizados com germinação de sementes de várias frutíferas nativas do Cerrado no Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaiá.

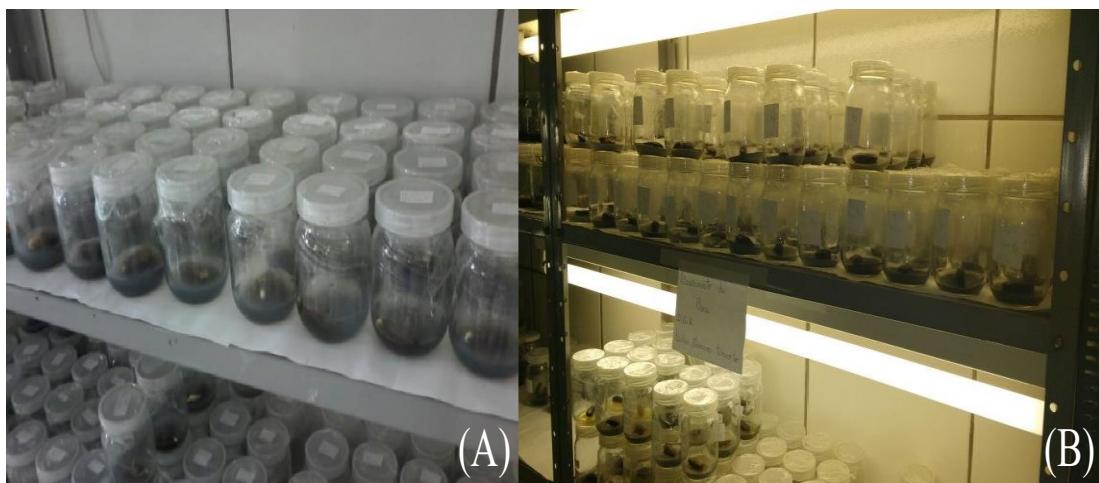


FIGURA 6 – Frascos contendo sementes de *D. alata* mantidos em semiluz (A) e luz direta (B) em sala de crescimento. Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaiá-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

Aos 35 dias, após a inoculação (DAI), com as plântulas em desenvolvimento (Figuras 7 A, B, C), foram realizadas avaliações das características físicas (Figuras 8 A, B, C) quanto ao número de folíolos (NF), o comprimento de parte aérea (CPA), o comprimento de raiz (CR) e diâmetro do caule (DC), em centímetros (cm), com auxílio de um paquímetro analógico.



FIGURA 7 – Plântulas de *D. alata* *in vitro* (A); Retirada da plântula do frasco (B); Panorama de uma plântula de *D. alata* cultivada *in vitro* (C). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

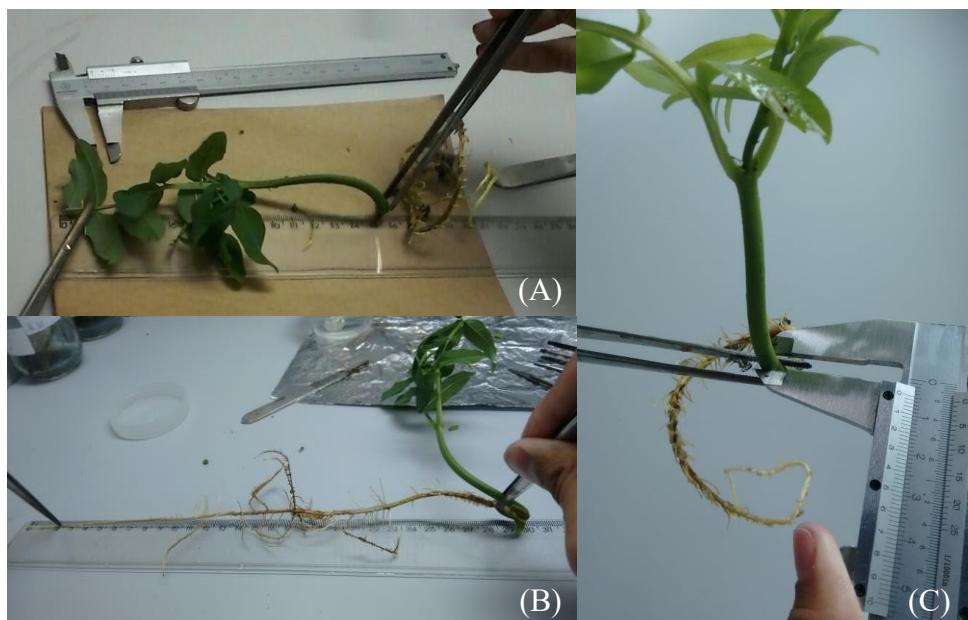


FIGURA 8 – Determinação do comprimento da parte aérea (A), comprimento de raiz (B) e diâmetro do caule da plântula de *D. alata* cultivada *in vitro* (C). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

4.4. Delineamento experimental e procedimentos estatísticos

O delineamento utilizado no experimento de germinação de sementes das matrizes de barueiro foi o inteiramente casualizado (DIC), com dez tratamentos e vinte repetições, no qual cada frasco continha uma única semente.

As características biométricas dos frutos e sementes e das plântulas das matrizes cultivadas *in vitro* de barueiro foram analisadas por meio da estatística descritiva.

Realizou-se a análise de variância para verificar possíveis diferenças entre as matrizes tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo as médias das variáveis significativas comparadas pelo teste de Tukey com probabilidade de 5%. As análises de variância e as estimativas de parâmetros foram obtidas com o auxílio do programa estatístico Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2016).

Após a realização da Anova, os dados foram submetidos à análise multivariada, realizando uma correlação biplot (MANOVA) e uma rede de correlação fenotípica. Sendo as análises estatísticas realizadas com o ambiente R (R Core Team, 2017) de computação estatística. Foi utilizada esta abordagem multivariada, considerando o modelo estatístico de delineamento inteiramente casualizado para obter a estimativa dos coeficientes de correlação parcial entre as variáveis (HAIR et al., 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das matrizes e biometria de frutos e sementes de barueiro

A estatística descritiva das características físicas das matrizes de barueiro avaliadas com base nos valores médios apresentou altura de planta, diâmetro de copa e circunferência de caule à altura do peito (CAP) de 13,35; 12,63; 1,85 m, respectivamente (Figuras 9 e 10). O maior valor de altura de planta foi verificado para a matriz 8 (17,70 m), enquanto para à CAP a matriz que se destacou foi a de número 4 (2,40 m). A matriz 1 apresentou 16,00 m de diâmetro de copa, o valor mais expressivo encontrado nas matrizes avaliadas. Os índices das variações entre os valores máximos e mínimos das características físicas das matrizes foram de 43,33 m - CAP; 46,68 m - altura de planta e 46,88 m - diâmetro de copa, respectivamente. Essas diferenças comprovam a variabilidade fenotípica das matrizes pesquisadas, o que respalda o presente estudo que visa à determinação das características biométricas como fonte de material para trabalhos com cultivo e conservação *in vitro*.

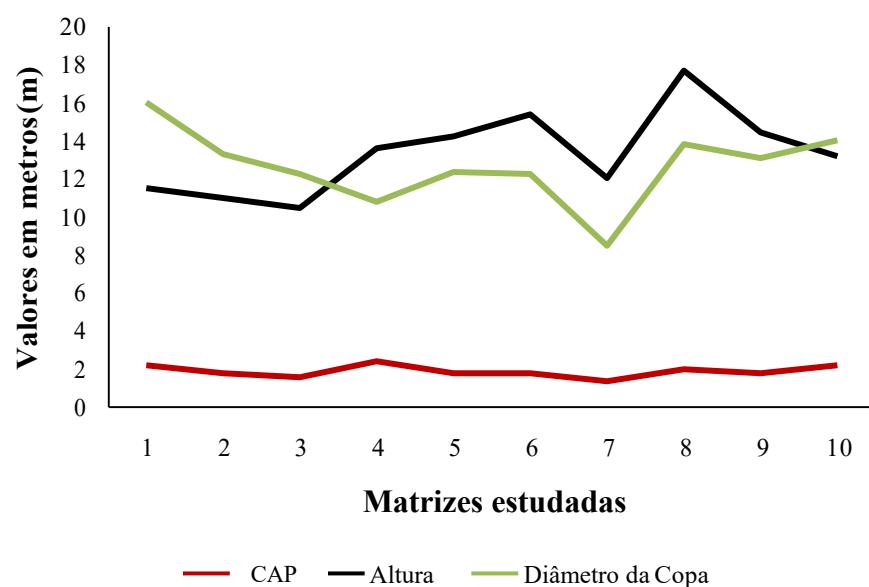


FIGURA 9 – Dados das características físicas para altura de planta, diâmetro de copa e circunferência de caule à altura do peito (CAP) (m) de dez matrizes de *D. alata* de ocorrência natural do Cerrado goiano coletadas no município de Pires do Rio em Outubro de 2017. Urutai-GO, 2018.

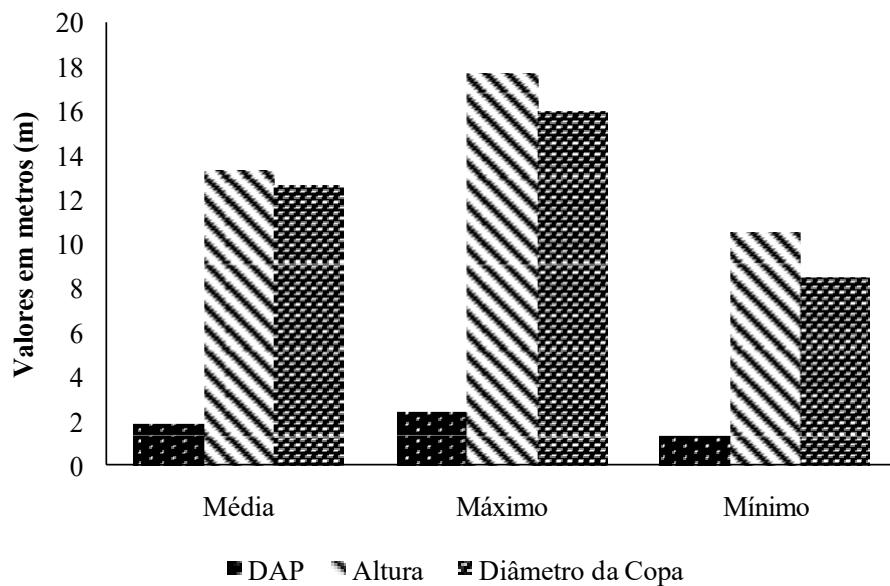


FIGURA 10 – Valores de média, máximo e mínimo das características físicas para altura de planta, diâmetro de copa e circunferência de caule à altura do peito (CAP) (m) de dez matrizes de *D. alata* de ocorrência natural do Cerrado goiano coletadas no município de Pires do Rio em Outubro de 2017. Urutaí-GO, 2018.

Em estudo com barueiro *ex situ*, aos 9 anos de idade, Zaruma et al. (2015) constataram valores de altura média entre progêneres dentro das procedências de 5,96 a 7,84 m, o CAP de 7,45 a 9,45 cm, o diâmetro de copa de 3,08 a 3,62 m. Esses dados são interessantes para contrastar com a presente pesquisa, mesmo que esta seja realizada com plantas de barueiro de ocorrência natural no Cerrado. Os dados encontrados no presente estudo são confirmados por Sano et al. (2010) que argumentam que as árvores de barueiro em local de origem possuem altura média de 15 m, podendo alcançar mais de 25 m. O formato da copa varia de alongada a arredondada, de 6 a 11 m de circunferência.

A massa média dos frutos de barueiro (Figura 11), obtida no presente estudo, foi de 38,55 g. Para os diâmetros longitudinais e transversais esses valores médios foram de 55,65 e 42,38 mm, respectivamente. Em estudo, Silva (1996) constatou que as dimensões dos frutos variam de 50 a 70 mm de comprimento por 30 a 50 mm de diâmetro, e a massa de 26 a 40 g. Os valores médios de massa de frutos de plantas de barueiro, oriundas de três regiões do estado de Goiás, relatadas por Correia (1999), variaram entre 29,16 g e 35,43 g, com média geral de 33,24 g. Os valores encontrados por estes autores estão semelhantes aos verificados na presente pesquisa com plantas nativas do Cerrado goiano.

A análise de variância das características biométricas dos frutos de barueiro (Figura 11) mostrou a existência de diferença significativa para todos os parâmetros estudados e nos níveis estruturais analisados. Foram observadas diferenças significativas para as características massa total, diâmetro longitudinal e transversal de fruto. Pode-se constatar que a matriz que apresentou maior valor nos parâmetros analisados foi a matriz 1 com 52,21 g; 60,75 e 48,09 mm, respectivamente. Mota (2013), em estudos sobre caracterização de frutos e sementes de barueiro de diferentes localidades (25 subpopulações nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo) encontrou valores de massa de fruto inteiro variando de 9,75 g a 72,97 g, com média de 28,13 g e o comprimento do fruto variando de 36,20 mm a 77,42 mm (média de 52,27 mm).

Mesmo com sua importância econômica e ecológica, grandes populações desta espécie foram destruídas e continuam sendo perdidas em ecossistemas nativos (SANO et al., 2004). Em decorrência disso, os trabalhos de biometria de plantas e cultivo *in vitro* para o barueiro podem ser determinantes para a estruturação da consolidação de bancos de germoplasma, seja *in vitro* ou *in vivo* nas mais diversas regiões de sua ocorrência, e em especial no Cerrado goiano.

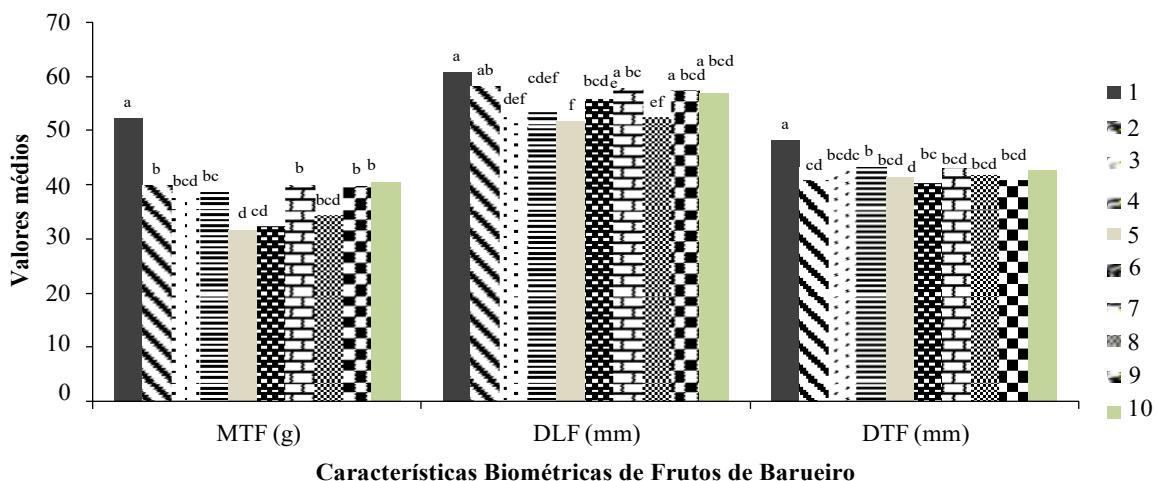


FIGURA 11 – Valores médios para os dados biométricos de massa total de fruto (MTF) (g); diâmetro longitudinal de fruto (DLF) e diâmetro transversal de fruto (DLF) (mm) de dez matrizes de barueiro de ocorrência natural do Cerrado Goiano coletados no município de Pires do Rio - GO. Urutaí-GO, 2018.

Ao se avaliar os caracteres biométricos para as sementes das matrizes de barueiro (Figura 12) constatou-se diferença significativa. As médias verificadas foram de 1,60 g; 25,99 e 12,08 mm quanto à massa e aos diâmetros longitudinais e transversais, respectivamente. Zuffo et al. (2014), realizando a caracterização

biométrica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.) na região leste de Mato Grosso, Brasil, observaram que a massa da semente no ano de 2012 concentrou-se em duas classes que compreenderam sementes com massa de 1,14 a 1,52 g, que representaram 78% das sementes, no ano seguinte ocorreu fato semelhante, porém, a massa das sementes ficou na classe de 0,95 a 1,33 g, concentrando 64% das sementes. Considerando ambos os anos, a média foi de 1,25 g.

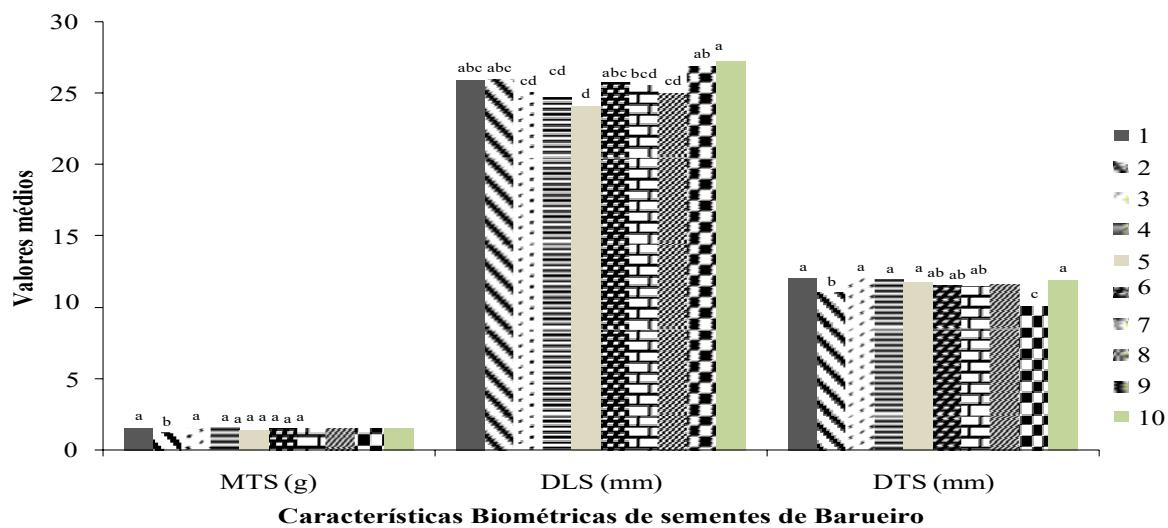


FIGURA 12. Valores médios para as características biométricas quanto à massa total de sementes (MTS) (g); diâmetro longitudinal de semente (DLS) e diâmetro longitudinal de semente (DLS) (mm) de dez matrizes de barueiro do Cerrado goiano coletados no município de Pires do Rio - GO. Urutai- GO, 2018.

Os frutos e sementes de barueiro apresentaram grandes variações biométricas, principalmente em relação ao volume e massa dos frutos e das sementes. Segundo Ferreira et al. (1998) a castanha do baru apresenta forma variando entre levemente ovalada e largo-elíptica; ápice levemente arredondado, coloração em vários tons de marrom (claro, médio e escuro, quase negro); comprimento, largura e espessura médias de 17,9, 9,7 e 8,33 mm, respectivamente. Mota (2013) encontrou 1,22 g de massa; 24,84 mm de comprimento; 10,55 mm de largura e 8,21 mm. Ao se contrastar os resultados, percebe-se que os valores encontrados na presente pesquisa estão de acordo com os verificados pelo autor já citado. O autor ainda argumenta que, para as variáveis de frutos, a maior proporção da variabilidade ocorreu entre matrizes dentro de subpopulações, fato comprovado também neste estudo.

Estes resultados demonstram que existe uma ampla variação fenotípica entre as matrizes na subpopulação, nos parâmetros avaliados para a região estudada. Esses dados

são importantes, pois, podem oferecer subsídios para estudos com sementes que possam gerar informações para pesquisas *in vitro* da espécie, tanto para propagação quanto para sua conservação.

5.2. Biometria de plântulas de diferentes matrizes cultivadas *in vitro*

No cultivo *in vitro* as matrizes apresentaram germinação (Figura 13 A) iniciando aos 5 dias após inoculação (DAI), ocorreu a protrusão da raiz primária (Figura 13 B), estendendo-se até os 8 DAI. Constatou-se também abertura de cotilédone aos 14 DAI e aos 22 DAI as plântulas já se apresentaram totalmente emergidas, apresentando 80 a 100% de desenvolvimento, ou seja, parte aérea e raízes em formação, porém algumas plântulas só atingiram seu pleno desenvolvimento após 45 DAI (Figura 14 A, B e C). Paula et al. (2016), avaliando a germinação de barueiro em diferentes meios de cultura, encontraram após 60 dias de cultivo uma média 90% de germinação e 80% de desenvolvimento, não havendo crescimento e desenvolvimento de parte aérea em uma pequena porcentagem das sementes, mesmo que essas estivessem intumescidas e com os cotilédones abertos.

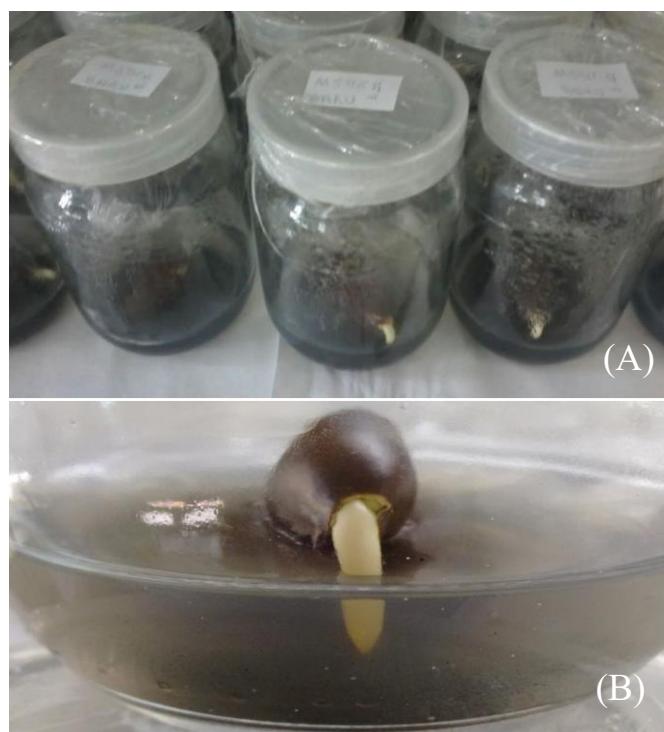


FIGURA 13 – Germinação *in vitro* de 10 matrizes de barueiro (*D. alata*) (A); Semente de barueiro apresentando protrusão radicular (B) aos 5 dias após inoculação (DAI). Laboratório de Biotecnologia Instituto Federal Goiano, Campus Urutai-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.



FIGURA 14 – Plântula de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) cultivada *in vitro* (A); Plântula em pleno desenvolvimento apresentando cotilédones abertos, raiz primária e raízes secundárias finas e parte aérea em formação (B) e plântula com tamanho diferenciado (C) aos 35 dias de cultivo. Laboratório de Biotecnologia Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

As estruturas das plântulas (Figura 15) observadas neste estudo são corroboradas pelo o que detalham Ferreira et al. (1998) sobre a caracterização biométrica da planta de barueiro. Segundo esses autores, a plântula possui raiz axial, pivotante, fina, sinuosa, cilíndrica, de cor ferrugínea até próximo ao ápice e amarelada no ápice e coifa, apresentando primórdios de raízes secundárias finas, curtas e de cor amarelada que se formam posteriormente, verificando-se também a presença de pelos. Hipocótilo curto, espesso, cilíndrico, consistência herbácea com leve achatamento dos lados, próximo à região de inserção dos cotilédones, cor passando de verde-claro a verde-escuro. Cotilédones, quando ocorre o rompimento dos tegumentos, são inicialmente semiabertos, isófilos, unilaterais, carnosos, plano convexos, viridescentes (amarelo-creme tornando-se verde). Os folíolos concolores (verde-claros, sendo a face dorsal opaca e a ventral brilhante) tem forma elíptica, estando os folíolos dobrados na ráquis e curvados dorsalmente em forma de acículas, expandindo-se à medida que a nova folha se desenvolve.

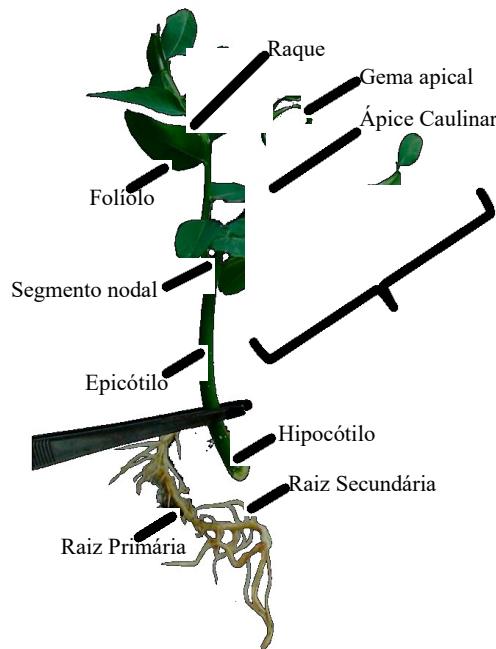


FIGURA 15 – Descrição da morfologia externa da plântula de barueiro cultivada *in vitro*. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula, 2018.

Na Figura 16, observa-se que as médias para os dados biométricos de comprimento aéreo (cm); comprimento de raiz (cm), número de folíolos e diâmetro do caule das dez matrizes de barueiro, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, foram de 13,20 cm; 22,93 cm; 21,9 e 0,31 mm, respectivamente.

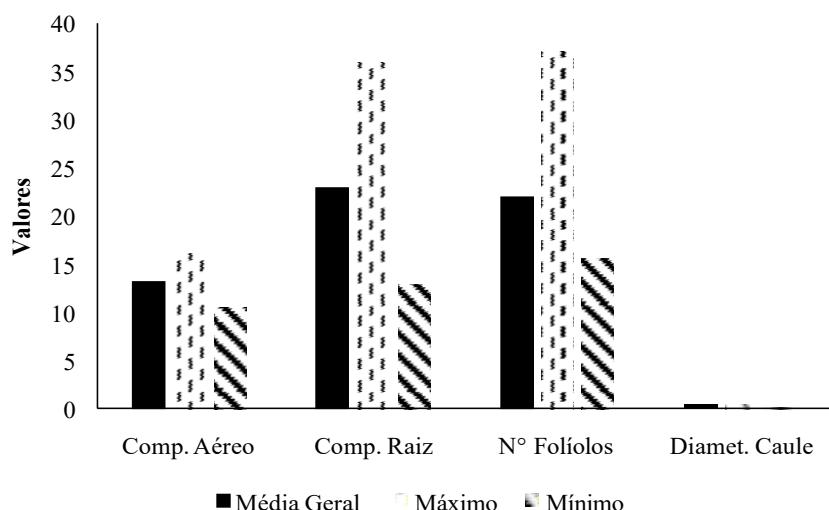


FIGURA 16 – Biometria de plântulas *in vitro* de barueiro quanto aos valores de média, máximo e mínimo para os dados biométricos de comprimento aéreo (cm); comprimento de raiz (cm) e número de folíolos de dez matrizes de barueiro aos 35 dias de cultivo *in vitro*. Urutaí-GO, 2018.

A análise de variância (Figura 17) dos valores médios para os dados biométricos de comprimento aéreo (cm); comprimento de raiz (cm) e número de folíolos de dez matrizes de barueiro, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, apresentaram diferença significativa para todos os parâmetros analisados. Quanto ao comprimento de parte aérea, a matriz 5 (Figura 16) foi a que manifestou o maior comprimento médio com 16,2 cm. Para o comprimento de raiz e número de folíolos, as matrizes com os maiores valores médios foram a 9 (35,9 cm - comprimento de raiz) e 10 (37,1 folíolos). Silva et al. (2016), estudando o estabelecimento e desenvolvimento inicial de *D. alata* *in vitro*, encontraram valores de parte aérea de 3,75 cm em plântulas desenvolvidas *in vitro* aos 60 dias de cultivo, em meio MS suplementado com 3 g L⁻¹ de carvão ativado e mantidas em temperatura de 25°C±1°C e com fotoperíodo de 16 horas/dia, evidenciando a superioridade das matrizes em estudo ao se avaliar o comprimento de parte aérea. Esse fenômeno pode auxiliar na diminuição do tempo de cultivo *in vitro* quando se espera alcançar mudas de comprimento acima de 10 cm, o que contribui para a diminuição dos custos com insumos nos trabalhos de pesquisa com barueiro do Cerrado.

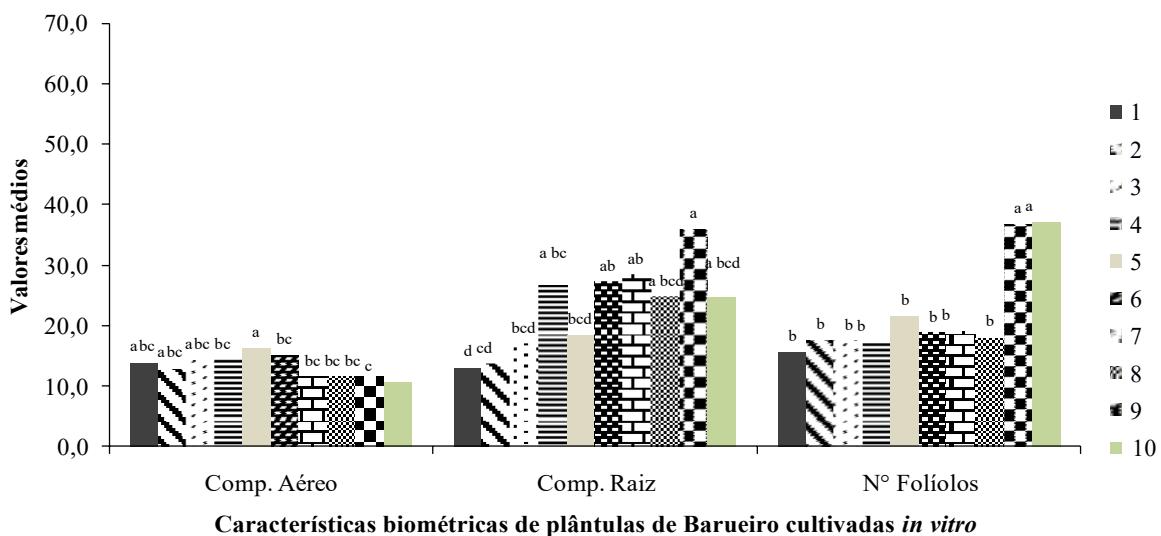


FIGURA 17 – Valores médios para as características biométricas de plântulas quanto ao comprimento aéreo (cm); comprimento de raiz (cm) e número de folíolos de dez matrizes de barueiro, aos 35 dias de cultivo *in vitro*. Urutai-GO, 2018.

O número de folíolos se manifestou diferente na matriz 1, com maior comprimento aéreo. Esse fato pode ter ocorrido em razão do estiolamento da matriz 1 que alcançou um comprimento diferenciado das demais. Essa manifestação pode ter sido por características genéticas e ambientais tais como o meio de cultura, reguladores de crescimento, carboidratos, bem como pela luz e fotoperíodo. Nesse sentido, ao se

trabalhar com plântulas para posteriores estudos que visem à utilização de segmentos nodais como explantes, as matrizes com maiores alturas podem ser mais promissoras, já que elas alcançam comprimentos maiores em menores tempos de cultivo *in vitro*.

Em estudo com conservação *in vitro* de barueiro, Borges et al. (2017) constataram que o comprimento médio das plântulas *in vitro* aos 35 dias após a inoculação foi de 5,0 cm e o número de folhas de 2,5. Ao se analisar estes dados verifica-se que as plântulas germinadas e desenvolvidas *in vitro* do presente trabalho possuem valores superiores aos encontrados pelos autores já elencados. Observou-se que mesmo a matriz com a menor média quanto à parte aérea (matriz 10) apresentou valores médios superiores com 10,5 cm de comprimento (Figura 17). É possível observar uma amplitude de aproximadamente 120% para plântulas de barueiro do estudo em questão.

Avaliando mudas no campo de *D. alata*, Venturolli et al. (2011) encontraram incremento de 4,0 cm ao ano para o crescimento da parte aérea dessa frutífera. Na presente pesquisa, ficou evidenciado que as plântulas cresceram em média 0,37 cm diárias quando cultivadas *in vitro*, já que elas ficaram 35 dias nessas condições. Contrastar esses valores de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* podem ser relevantes, visto que o objetivo final dos protocolos de micropropagação é oferecer subsídios para que essas mudas possam manifestar todo seu potencial em campo. Assim, observa-se que a germinação *in vitro* de barueiro pode ser uma tecnologia interessante não só para que se possa manter e conservar esse material tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mas, também no quesito propagação, pois, essas mudas quando cultivadas nestas condições estarão isentas de doenças e intempéries ambientais.

Quando se analisa a biometria do comprimento de raiz da presente pesquisa, esses dados também são mais substanciais mesmo para as matrizes com a menor média (matriz 1), cujo valor foi de 13 cm. Na micropropagação de fruteiras nativas do Cerrado, os reguladores de crescimento podem ganhar uma importância ainda maior, visto que essas espécies muitas vezes necessitam de estímulos especiais, gerados por tais compostos, para a sua adaptação e crescimento *in vitro* (PINHAL et al., 2011).

Com efeito, o uso de BAP a 1,0 mg L⁻¹ na elaboração do meio de cultura para a germinação *in vitro* do presente estudo pode ter determinado este padrão de desenvolvimento para esta frutífera nativa. Outro fator importante a ser abordado diz respeito às amplitudes genéticas das plantas nativas. Esse fator pode ser determinante nas diferentes manifestações de plantas que ainda não foram domesticadas. Nesse

sentido, Faleiro et al. (2007) argumentam que os estudos que contemplam a conservação da variabilidade genética são relevantes, pois podem garantir o uso adequado desse recurso genético, assim como subsidiar estratégias eficientes de manutenção e manejo e ao mesmo tempo auxiliar no controle da estabilidade genética nas coleções de germoplasma.

5.3. Correlação entre caracteres biométricos de matrizes, frutos, sementes e de plântulas de diferentes matrizes cultivadas *in vitro*

A abordagem da interpretação dos dados de comportamento biométrico de frutíferas nativas tanto no local de ocorrência natural, quanto em ambiente controlado, no caso *in vitro*, necessitam de análises e interpretações no sentido de entender e correlacionar às variações que ocorrem conjuntamente. Assim, quando um fenômeno depende de muitas variáveis, não basta conhecer informações estatísticas isoladas, mas é necessário, também, conhecer a totalidade dessas informações fornecidas pelo conjunto das variáveis e suas relações (VICINI, 2005).

Observa-se na Figura 18 uma matriz de correlação em que as variáveis estudadas se encontram mais correlacionadas quando estas estão mais próximas entre si e quanto à espessura da linha (quanto mais espessa, maior a correlação). As linhas que se encontram na cor verde estão se correlacionando positivamente e as de vermelho negativamente. Nota-se que, para a massa total do fruto (MTF), a variável básica do estudo em questão está forte e positivamente correlacionada ao diâmetro lateral (DLF) e transversal (DTF) do fruto. Todavia, percebe-se que há uma correlação negativa e fraca ao se avaliar o comprimento de raiz (CR) em conjunto com o comprimento aéreo (CA).

O coeficiente de correlação calculado para o DLF e DTF entre a MTF foi significativo e positivo ($r=80^*;84^*$) para os frutos colhidos na região do Cerrado goiano. Essa correlação já era esperada, pois indica que quanto maior o fruto, de mais massa total ele será constituído. A correlação é um parâmetro estatístico que avalia o grau de associação ou similaridade entre duas características, sendo que esse grau de associação é estimado pela variação em conjunto de dois caracteres quaisquer. Quando a correlação é obtida a partir dos fenótipos de indivíduos, essa inclui os efeitos genéticos e ambientais, sendo denominada correlação fenotípica (OLIVEIRA, 2006).

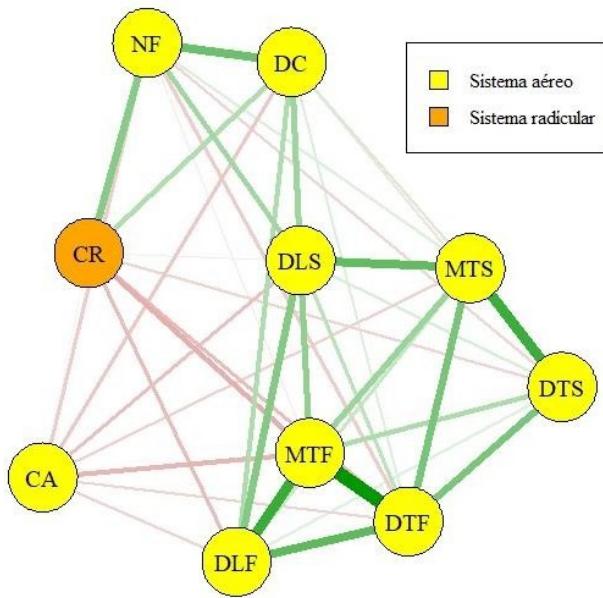


FIGURA 18 – Rede de correlação fenotípica do barueiro. Linhas verdes representam correlações positivas e as linhas vermelhas representam as correlações negativas. A largura da linha é proporcional à força da correlação. (MTF) Massa total do fruto, (MTS) Massa total da semente, (DTF) Diâmetro transversal do fruto, (DTS) Diâmetro transversal da semente; (DLF) Diâmetro lateral do fruto; (DLS) Diâmetro lateral da semente; (CA) Comprimento aéreo; (NF) Número de folíolos; (DC) Diâmetro do caule; (CR) Comprimento radicular. Urutaí-GO, 2018.

Para o CR (Figura 18), observa-se correlação negativa entre os parâmetros avaliados, exceto para MTS e DLS (0,25 e 0,24). A correlação negativa pode ser indício de correlações opostas, ou seja, quanto maior a raiz, menor as demais características biométricas avaliadas, sendo o inverso também verdadeiro.

Ao se analisar a correlação das vitroplantas com as características biométricas de frutos e sementes averigua-se que o NF das vitroplantas possui correlação moderada com o DLS ($r=70^*$). O DC das vitroplantas possui correlação positiva e significativa com DLS e NF da vitroplanta ($r=81^*; 85^*$).

Ao se avaliar duas características, e quando elas possuírem alta herdabilidade, a correlação genética é a principal determinante da correlação fenotípica. Ao contrário, a correlação fenotípica pode ser determinada a princípio pela correlação ambiental. Valores negativos de correlação ambiental podem indicar que o meio favorece um caráter em detrimento de outro, valores positivos indicam que os dois caracteres têm o mesmo comportamento em um determinado ambiente (VENKOVSKY; BARRIGA 1992).

No presente estudo, observou-se que as sementes podem não se correlacionar positivamente com o desenvolvimento de plântulas *in vitro*, fazendo com que o padrão determinante desse comportamento seja as condições ambientais em que estejam sendo cultivadas. Desta forma, é possível que, para a espécie em questão, dependendo do tipo de cultivo (meio de cultura, fotoperíodo, temperatura) seja possível desenvolver condições mais promissoras para a conservação de germoplasma *in vitro*. Esta técnica pode ser útil em programas de conservação e manutenção de germoplasmas.

Constata-se que a matriz (Figura 19) que expressou maior massa total dos frutos (MTF) foi a matriz 1, sendo estatisticamente igual a matriz 3 e 4, tendo também se diferenciado para os valores de diâmetro transversal da semente (DTS), diâmetro transversal do fruto (DTF) e massa total da semente (MTS) superiores as demais matrizes. Observar-se que a variável canônica (Can1) representou 45,2% e a Can 2 21,3% da variação dos dados com a apresentação de valores significativos (acima de 60,0%) para prosseguir com a análise em estudo.

Quanto ao diâmetro de caule (DC), número de folíolos (NF), diâmetro longitudinal de semente (DLS) e comprimento de raiz (CR) das vitroplantas, as matrizes com maiores valores foram as matrizes 9 e 10 (Figura 18).

O DC, o NF e o DTF foram as variáveis que mais influenciaram as matrizes estudadas na região de Pires do Rio no Cerrado goiano. Essa análise permite inferir que as variáveis já citadas são fenômenos que caracterizam a biometria para todas as matrizes trabalhadas.

Essas informações também levam a crer que os frutos com maiores DTF podem promover o desenvolvimento de plântulas com padrões promissores de componentes tais como caule, folíolos, raízes, caracterizando uma plântula *in vitro* normal cuja biometria para CA (cm), CR (cm), NF e DC (mm) seriam de valores entre 10,5-13,2; 13,0-35,9; 15,6-37,1; 0,2-0,5, respectivamente, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.

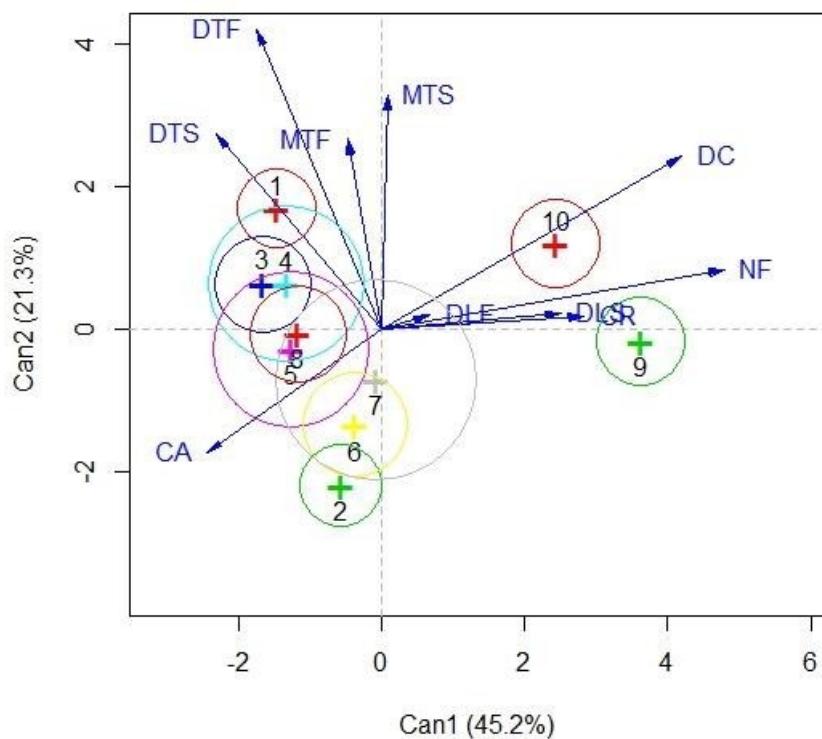


FIGURA 19 – Biplot com as variáveis canônicas (Can1 e 2) contendo scores médios de 10 matrizes de barueiro com 9 variáveis avaliativas. (MTF) Massa total do fruto, (MTS) Massa total da semente, (DTF) Diâmetro transversal do fruto, (DTS) Diâmetro transversal da semente; (DLF) Diâmetro longitudinal do fruto; (DLS) Diâmetro longitudinal da semente; (CA) Comprimento aéreo; (NF) Número de folíolos; (DC) Diâmetro do caule; (CR) Comprimento radicular. Urutaí-GO, 2018.

Essas caracterizações podem contribuir para a definição de um padrão biométrico de cultivo *in vitro* de barueiro, servindo de subsídios para pesquisas com produção de mudas em larga escala, assim como estudos para a manutenção e conservação *in vitro* dessa espécie.

6 CONCLUSÕES

Os frutos de barueiro com diâmetro transversal maiores são mais indicados para o cultivo *in vitro* de plântulas de barueiro até 35 dias após semeadura;

As matrizes trabalhadas se apresentaram diferenciadas quanto às características biométricas avaliadas;

As matrizes de barueiro deste trabalho são promissoras quanto ao cultivo *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS

- BORGES, B. M. F; DUARTE, G. O; SILVA, C. I; RIBEIRO, J. S; FREITAS, M. A. M; PAULA, M. S. P; VIEIRA, M. C. Barueiro do Cerrado *in vitro*: conservação em Sorbitol. Resumo. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 8 (2017) 5 – Edição Suplementar. Disponível em: <<https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos>>. Acesso em: dez. de 2017.
- CARRAZZA, L; ÁVILA, J. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Baru**. 2. ed. Brasília: Ed. Instituto Sociedade, População e Natureza, 2010. 56 p. (Série Manual Tecnológico).
- CORRÊA, G. C. **Avaliação comportamental de plantas de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nos cerrados do Estado de Goiás**. Tese de Doutorado. 111 f. Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 1999.
- FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.
- FELFILI, J. M; RIBEIRO, J. F; BORGES FILHO, H.C; VALE, A. T. Potencial econômico da biodiversidade do Cerrado: estádio atual e possibilidades de manejo sustentável dos recursos da flora. In: AGUIAR, L. M. S; CAMARGO, A. J. A. (Eds.). **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília: Embrapa. 2004, p. 177-220.
- FERREIRA, R.A; BOTLHO, S. A; DAVIDE, A. C; MALAVASI, M. M. Caracterização morfológica de fruto, semente, plântulas e mudas de *Dipteryx alata* Vogel – Baru (Leguminosa Papilionoideae). **Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 73-87, 1998.
- FRANZON, R. C. **Fruteiras nativas do Cerrado têm potencial para exploração**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. Disponível em: <www.cpac.embrapa.br/download/1698/t>. Acesso em: jan. 2018.
- HAIR Jr., J. F; BLACK, W. C; BABIN, B. J; ANDERSON, R. E. & TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre, Bookman, 2009. 688 p.
- JUNQUEIRA, N. T. V; FALEIRO, F. G; BRAGA, M. F; PEIXOTO, J. R. Domesticação de espécies da flora nativa do Cerrado. In: PARRON, L. M; AGUIAR, L. M. S; DUBOC, E; OLIVEIRA-FILHO, E. C; CAMARGO, A, J, A; AQUINO, F. G. (Org.). **Cerrado: Desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. Brasília: Embrapa Cerrados, 2008, v. 1, p. 125-163.
- KAGEYAMA, P. Y; GANDARA, F. B; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.
- MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da gabirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.)**. 2000. 117 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, MG.

MOTA, E. E. S. **Caracterização fenotípica e variação genética quantitativa em *Dipteryx alata* Vog. (Barueiro) do Cerrado.** Dissertação. 84 f. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Vegetal da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO. 2013.

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

OLIVEIRA, A. N; SILVA, A. C; ROSADO, S. C. S; RODRIGUES, E. A. C. Variação genética entre e dentro de procedências de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 6, p. 905-909, 2006.

PAIVA, J. R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia.** Fortaleza: Embrapa-CNPAT, p. 135, 1988.

PAULA, M. S. P; AMARO, C. L; LAMIM, L. M. M; LUZ, J. M. Q; VIEIRA, M. C. Germinação e sobrevivência *in vitro* de sementes *Dypterix alata* Vog. em diferentes composições de meio de cultura e locais de coleta. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE FRUTICULTURA, São Luis-MA. **Anais...** São Luis-Brasil, 2016.

PINHAL, H. F; ANASTÁCIO, M. A; CARNEIRO, P. A. O; SILVA, V. J; MORAIS, T. P; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Áustria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

SANO, S. M; BRITO, M. A; RIBEIRO, J. F. Baru. In: VIEIRA, R. F; AGOSTINICOSTA, T. S; SILVA, D. B; FERREIRA, F. R; SANO. S. M; (Ed.) **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010, 322 p.

SANO, S. M; RIBEIRO, J. F; BRITO, M. A. de. **Baru:** biologia e uso. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004, 52 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 116).

SILVA, F. A. S; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA, H. F. J; ASMAR, S. A; OLIVEIRA, R. C; MELO, B; LUZ, J. M. Q; MOACIR PASQUAL. *In vitro* establishment and early development of barueiro (*Dipteryx alata* Vogel). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 1779-1790, 2016.

SILVA, S. **Frutos no Brasil.** São Paulo: Empresa das Artes, 1996.

SOUZA, H. A; NAVES, L. C. R. Preservação do Bioma Cerrado e o aproveitamento dos frutos nativos na merenda escolar em Goiânia no contexto da educação ambiental.

In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL CAMPINA GRANDE, Paraíba. **Anais...** Paraíba, 2016.

VENCOVSKY, R; P. BARRIGA. 1992. Genética biométrica no fitomelhoramento. **Rev. Bras. Genética**, Ribeirão Preto – SP, 496 p.

VENTUROLI, F; FAGG, C. W; FELFILI, J. M. Desenvolvimento inicial de *Dipteryx alata* Vogel e *Myracrodruron urundeuva* Allemão em plantio de enriquecimento de uma floresta estacional semidecídua secundária. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 482-493, 2011.

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. Monografia, 215 f, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria – RS, 2005.

ZARUMA, D. U. G; CANUTO, D. S. O; PUPIN, S; CAMBUIM, J; SILVA, M. A; MORI, E. S; SEBBENN, A. M; MORAES, M. L. T. Variabilidade genética em procedências e progêneres de *Dipteryx alata* Vogel para fins de conservação genética e produção de sementes. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 43, n. 107, p. 609-615, 2015.

ZUFFO, A. M; ANDRADE, F. R; ZUFFO JÚNIOR, J. M. Caracterização biométrica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.) na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 463-47, 2014.

CAPÍTULO 3: CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE MATRIZES DE BARUEIRO POR CRESCIMENTO LENTO

1 RESUMO

PAULA, MARIANA SILVA PEREIRA DE. **Conservação *in vitro* de matrizes de barueiro por crescimento lento.** 2018. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

O Cerrado é o segundo maior bioma do país e possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo. Tendo em vista a vulnerabilidade das espécies à ação antrópica e intensa devastação dos seus campos nativos ameaçando-as de extinção, torna-se iminente a necessidade de alternativas que viabilizem a preservação dessas espécies. O barueiro é uma das frutíferas nativas do Cerrado que apresenta uma multiplicidade de usos, constituindo-se como uma espécie chave para estudos de domesticação e cultivo. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo para a conservação *in vitro* de barueiro, sob regime de crescimento lento com a utilização de agentes osmóticos a baixas temperaturas, e avaliar a retomada de seu crescimento *in vitro* após conservação. Sob regime de crescimento lento explantes de segmentos nodais retirados de plântulas de barueiro, com 35 dias de cultivo, foram inoculados em meio MS 50% suplementado com 1,0 g L⁻¹ de benzilaminopurina, 15,0 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 6,0 g L⁻¹ de ágar e acrescido de diferentes concentrações de manitol e sorbitol em diferentes condições de temperatura (18°C e 20°C). Foram realizadas avaliações ao longo dos 30, 45, 60, 90 e 120 dias quanto ao número de brotos e de folíolos nas duas temperaturas estudadas. Aos 120 dias após conservação, a retomada de crescimento foi realizada em meio de cultura MS 100%, com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol e 6 g L⁻¹ de ágar, com variação de benzilaminopurina associado com 0,25 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético. Avaliou-se o número de brotos e o número de folíolos desenvolvidos a partir de segmentos nodais de barueiro após 35 dias de cultivo a 25±2°C e foram feitas análises biométricas dos brotos. Por intermédio dos resultados obtidos, a temperatura de 18°C e o agente osmótico manitol a 20 g L⁻¹ se destacaram, mostrando crescimento lento até 120 dias de armazenamento. O BAP não promoveu incremento na retomada de crescimento *in vitro* de barueiro. Faz-se necessário novos estudos para a promoção de crescimento lento baseados na possibilidade de recuperação do maior número de plantas.

Palavras-chave: *Dipteryx alata* Vog., crescimento mínimo, reguladores osmóticos, retomada *in vitro*.

¹ Comitê Orientador: José Magno Queiroz Luz – UFU (Orientador) e Muza do Carmo Vieira.

2 ABSTRACT

PAULA, MARIANA SILVA PEREIRA DE. *In vitro conservation of mother plant of barueiro by slow growth.* 2018. 93p. Dissertation (Masters in Agronomy/Phytotechny) -Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG.¹

The Cerrado is the second largest biome in the country and has the richest flora in the world. Given the vulnerability of species to anthropic action and the intense devastation of their native fields, threatening them with extinction, the need for alternatives that allow the preservation of species is imminent. The barueiro is one of the native fruits of the Cerrado that presents multiplicity of uses, being a key species for studies of domestication and cultivation. Thus, the present work aims to develop a protocol for the in vitro conservation of barueiro, under a regime of slow growth with the use of osmotic agents at low temperatures and to evaluate the resumption of its growth in vitro after conservation. Under a slow growth regime, nodal segment explants from barueiro seedlings with 35 days of cultivation were inoculated in 50% MS medium supplemented with 1.0 g L⁻¹ benzylaminopurine, 15.0 g L⁻¹ sucrose, 1.0 g L⁻¹ activated carbon, 0.1 g L⁻¹ myo-inositol, 6.0 g L⁻¹ agar and increased concentrations of mannitol and sorbitol at different temperature conditions (18°C and 20°C). Evaluations were carried out during the 30, 45, 60, 90 and 120 days in relation to the number of shoots and leaflets in the two temperatures studied. At 120 days after storage, growth resumption was performed in 100% MS medium with 30 g L⁻¹ sucrose, 1.0 g L⁻¹ activated carbon, 0.1 g L⁻¹ myo-inositol and 6 g L⁻¹ of agar, with a variation of benzylaminopurine associated with 0.25 mg L⁻¹ of naphthaleneacetic acid. The number of shoots and the number of leaflets developed from nodal segments of barueiro were evaluated after 35 days of cultivation at 25 ± 2°C and biometric analyzes of shoots were carried out. By means of the results obtained, the temperature of 18°C and the osmotic agent manitol at 20 g L⁻¹ stood out, showing slow growth until 120 days of storage. The BAP did not promote an increase in the in vitro growth of barueiros. Further studies are needed to promote slow growth based on the possibility of recovering the largest number of plants.

Keywords: *Dipteryx alata* Vog., minimal growth, osmotic regulators, recovery *in vitro*.

¹ Guidance Committee: José Magno Queiroz Luz – UFU (Major Professor) and Muza do Carmo Vieira – IFGoiano – Campus Urutáí.

3 INTRODUÇÃO

No Cerrado se encontra a segunda maior biodiversidade da América do Sul, superada apenas pela Amazônia. Toda essa riqueza natural demonstra a importância dos estudos para a conservação e o manejo de sua diversidade biológica. Conservar um bioma é garantir a manutenção das espécies que nele se estabeleceram e, em consequência, a sua existência para as gerações atuais e futuras. Existem cerca de 6.500 espécies de plantas no Cerrado, das quais mais de 200 já têm algum uso econômico identificado (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

O barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) é uma das frutíferas nativas que se encontra com um grande potencial econômico no Bioma Cerrado, pois possui diversas possibilidades de utilização tanto no âmbito alimentício e agroindustrial, forrageiro, silvicultural e pastoril quanto no paisagístico e no reflorestamento de áreas degradadas. Sua importância também está ligada ao social e ecológica, pois seus frutos amadurecem na época seca, alimentando muitas espécies da fauna local, incluindo os bovinos (SILVA et al., 2001; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

Diante desse potencial e da crescente necessidade de valorização e preservação das espécies nativas, as técnicas de cultura de tecidos em plantas, em alguns casos, podem representar a única estratégia para conservar essas espécies fora do seu habitat, porém, o nível de conhecimento sobre essas técnicas em fruteiras nativas do Cerrado é incipiente, pois essas plantas encontram-se, ainda, em estado selvagem, apresentando grande variabilidade genética (FERREIRA et al., 1998; ALMEIDA, 2009).

Dentre as técnicas biotecnológicas que vêm apresentando êxito destaca-se a conservação *in vitro*, sendo de grande importância para programas de conservação e uso de recursos genéticos visando ao desenvolvimento, domesticação e melhoramento genético das espécies, pois seu uso sustentável deve ser valorizado como produto para contribuir com a conservação da natureza.

A conservação *in vitro*, apesar de manter o germoplasma conservado por médios e longos períodos, é uma metodologia que vem sendo aperfeiçoada na manutenção dos bancos ativos de germoplasma e, de acordo com Engelmann (2011) e Lima-Brito et al. (2011), dentre os tipos de conservação, o método de crescimento mínimo ou lento tem sido utilizado com sucesso para a conservação *in vitro* a curto e médio prazo de muitas espécies. Ele consiste na redução do crescimento e no aumento dos intervalos entre os

subcultivos, sem afetar significativamente a viabilidade dos explantes, decorrente das alterações físicas do ambiente (temperatura e luminosidade) e/ou química do meio de cultivo (retardadores de crescimento, componentes orgânicos e inorgânicos).

Uma abordagem amplamente aplicada envolve a adição de agentes osmóticos e/ou redução da temperatura na qual as espécies são mantidas. Em geral, temperaturas entre 15 a 20°C promovem maiores taxas de sobrevivências, associadas à menor taxa de crescimento, sem mudanças morfológicas aparentes e alterações anatômicas dos tecidos vegetais (PEDROSO et al., 2010; SILVA & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011).

Os trabalhos de conservação *in vitro* de barueiro ainda são escassos e desenvolver metodologias que priorizem protocolos de micropropagação e conservação *in vitro* desta espécie é interessante para a manutenção de germoplasma, produção de mudas e melhoramento de espécies nativas do Cerrado.

A utilização desta técnica biotecnológica visa à manutenção da espécie, permitindo uma difusão de tecnologias de conservação de germoplasma para os órgãos de preservação ambiental, possibilitando o melhor uso sustentável das espécies nativas livres da extinção. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo para a conservação *in vitro* de *Dipteryx alata* Vog., o barueiro do Cerrado, sob regime de crescimento mínimo, com a utilização de agentes osmóticos a baixas temperaturas e avaliar a retomada de seu crescimento *in vitro* após conservação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ETAPA 1: Conservação *in vitro* de barueiro (*Dipteryx alata* Vog). em diferentes temperaturas e agentes osmóticos.

Para a realização da conservação *in vitro* de barueiro sob regime de crescimento lento foram utilizados como explantes segmentos nodais, de aproximadamente 2,0 cm de comprimento, retirados de plântulas de barueiro cultivadas *in vitro* (Figura 1 A) em meio MS com metade da concentração de sais (50%), suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado e 6,0 g L⁻¹ de ágar sob 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas com 35 dias de cultivo. Foram utilizadas como plântulas padrão para retirada do segmento nodal (Figura 1 A), as plântulas que possuíam a parte aérea com o segundo par de folhas alternas desenvolvidas, contendo folíolos, e com a gema apical curvada dorsalmente em forma de acícula, expandindo-se à medida que a nova folha se desenvolve (FERREIRA et al., 1998).

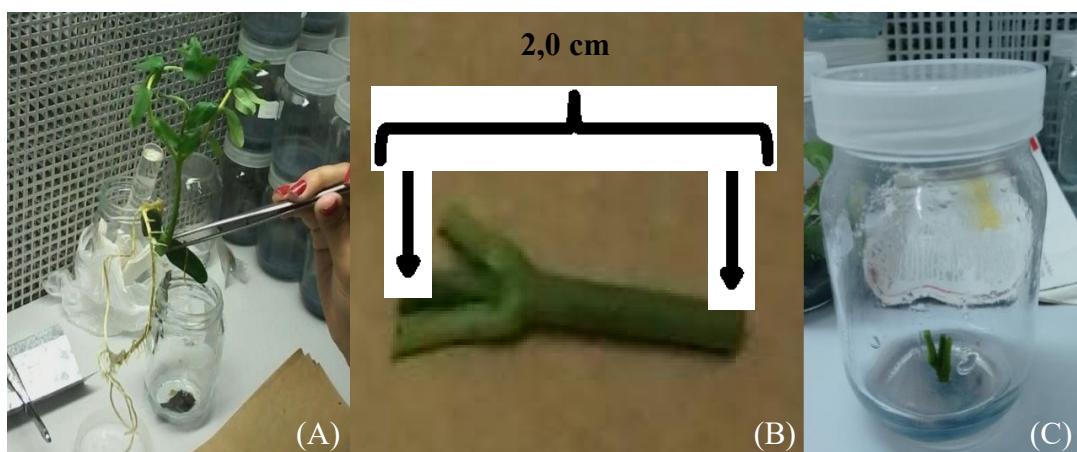


FIGURA 1 – Plântula padrão de barueiro para retirada do explante (A); Explante de segmento nodal de barueiro (B); Inoculação de segmento nodal de barueiro em frasco com meio de cultura (C). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutai-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais (Figura 1 B) foram retirados com lâminas de bisturi nº 11 e inoculados (Figura 1 C) em meio MS com metade da concentração dos sais (50%), suplementado com 1,0 g L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 15,0 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 6,0 g L⁻¹ de ágar e acrescido de diferentes concentrações de manitol e sorbitol em diferentes

condições de temperatura (Tabela 1). O pH foi ajustado para 5,8±2. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e autoclavados a 121°C, durante 20 minutos.

As avaliações foram realizadas ao longo dos 30, 45, 60, 90 e 120 dias após inoculação (DAI), quanto ao número de brotos e de folíolos nas duas temperaturas (18°C e 20°C) e, ao final dos 120 dias de conservação, avaliou-se a taxa de sobrevivência dos explantes.

TABELA 1 – Tratamentos utilizados para a conservação *in vitro* de segmentos nodais de barueiro em duas temperaturas e diferentes concentrações e agentes osmóticos (manitol e sorbitol), sob regime de crescimento lento. Urutaí-GO, 2018.

Tratamentos	Temperatura (°C)	Agentes Osmóticos (g L ⁻¹)	
		Manitol	Sorbitol
T1	18	0,00	0,00
T2	18	10,0	10,0
T3	18	15,0	20,0
T4	18	20,0	30,0
T5	20	0,0	0,0
T6	20	10,0	10,0
T7	20	15,0	20,0
T8	20	20,0	30,0

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições por tratamento, em que cada repetição continha quatro frascos e cada frasco contendo um explante (segmento nodal) de barueiro. Foi instalado um experimento separadamente para cada temperatura, utilizando as duas concentrações dos agentes osmóticos manitol e sorbitol.

Após as avaliações, realizou-se a análise estatística das variáveis número de brotos, número de folíolos e taxa de sobrevivência sendo utilizado o modelo linear generalizado (GLM) binomial com função de ligação logit em função dos tratamentos (doses de manitol e sorbitol) sob as temperaturas 18°C e 20°C. Foram construídos intervalos de 95% de confiança para a comparação desses e todas as análises estatísticas foram realizadas com o ambiente R (R Core Team, 2017) de computação estatística.

4.2. ETAPA 2: Retomada do crescimento dos segmentos nodais de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.), conservados *in vitro*.

Após o período de 120 dias de conservação *in vitro* de barueiro, os brotos desenvolvidos a partir de segmentos nodais foram transferidos para frascos contendo

meio de cultura MS com 100% da concentração dos sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar, com variação de benzilaminopurina (BAP) associado com 0,25 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) (Tabela 2). Os brotos desenvolvidos a partir de segmentos nodais foram padronizados quanto ao comprimento, deixando-os com apenas 2 cm, para maior uniformidade nas avaliações. O pH foi ajustado para 5,8±2. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e autoclavados a 121°C, durante 20 minutos.

TABELA 2 - Tratamentos utilizados para a retomada de crescimento dos segmentos nodais de barueiro, advindos da conservação *in vitro* sob as temperaturas de 18° e 20°C, submetidos a diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP). Urutaí-GO, 2018.

Tratamentos	Temperatura (°C)	BAP (mg L ⁻¹)
T1	18	0,0
T2	18	1,0
T3	18	2,0
T4	18	3,0
T5	20	0,0
T6	20	1,0
T7	20	2,0
T8	20	3,0

A retomada de crescimento *in vitro* dos segmentos nodais de barueiro ocorreu em sala de crescimento, a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas. As avaliações foram realizadas aos 35 dias após inoculação (DAI). Avaliou-se o número de brotos e o número de folíolos desenvolvidos a partir de segmentos nodais de barueiro e foram feitas análises biométricas (Figura 02 A, B, C e D) quanto ao comprimento de parte aérea (CPA), em centímetros (cm), com auxílio de um paquímetro analógico e da massa fresca (MF) e seca (MS) dos brotos desenvolvidos, em gramas (g), e obtida por meio de pesagem individual em balança digital. A massa seca foi realizada em estufa, sob temperatura de 60°C por 48 horas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com vinte repetições por tratamento, em que cada frasco continha um explante (segmento nodal) de *D. alata* proveniente da conservação *in vitro*.

Após as avaliações, as variáveis foram submetidas à análise de variância com o auxílio do programa R (R Core Team, 2017) de computação estatística.

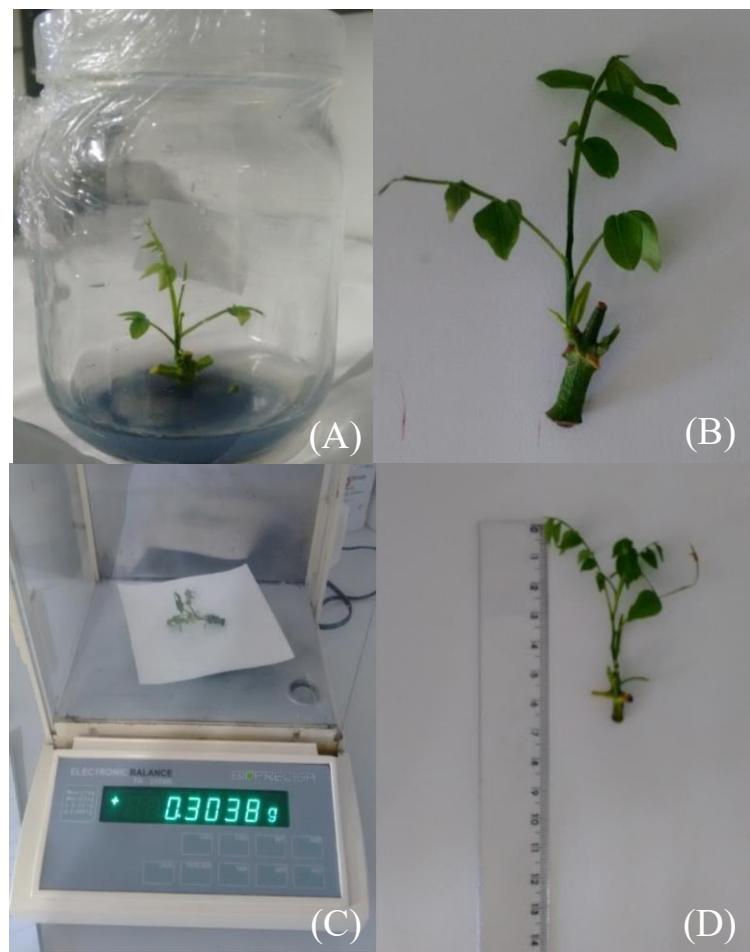


FIGURA 02 – Broto após 35 dias de retomada de crescimento para caracterização biométrica (A); Broto desenvolvido (B); Determinação da massa fresca (C) e comprimento de broto (D) de segmento nodal de barueiro, após a retomada de crescimento, sob diferentes doses de BAP. Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutáí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ETAPA 1: Conservação *in vitro* de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) em diferentes temperaturas e agentes osmóticos.

Um dos aspectos fundamentais na conservação *in vitro* é adequar conjuntamente as concentrações de substâncias com potencial osmorregulador e as temperaturas a fim de promover o crescimento lento e possibilitar a retomada de crescimento de explantes após o período de conservação *in vitro* proposto, promovendo assim uma manutenção da viabilidade das plantas após o período de incubação.

Diante dos resultados encontrados no presente trabalho, a utilização de diferentes agentes osmóticos e concentrações, acrescentados ao meio de cultura conjuntamente com temperaturas baixas, age sobre o crescimento e desenvolvimento dos explantes de baru na conservação *in vitro* por 120 dias.

A taxa de sobrevivência dos explantes de baru, sob temperatura de 18°C com diferentes doses de manitol e sorbitol foram superiores, apresentando p-valor menor que 0,05, em relação à temperatura de 20°C (Figura 3 A, B).

Comprando a sobrevivência dos explantes mantidos a 18°C em meio de crescimento lento com a presença de reguladores osmóticos (manitol e sorbitol) houve diferença estatística entre as testemunhas - 0 g L⁻¹ de sorbitol e manitol - em relação à dosagem de 15 g L⁻¹ de manitol, que apresentou baixa taxa de sobrevivência (Figura 3 A).

Na conservação *in vitro* de baru, em temperatura de 20°C, não houve diferença estatística em nenhum dos tratamentos contendo os reguladores osmóticos manitol e sorbitol (Figura 3 B).

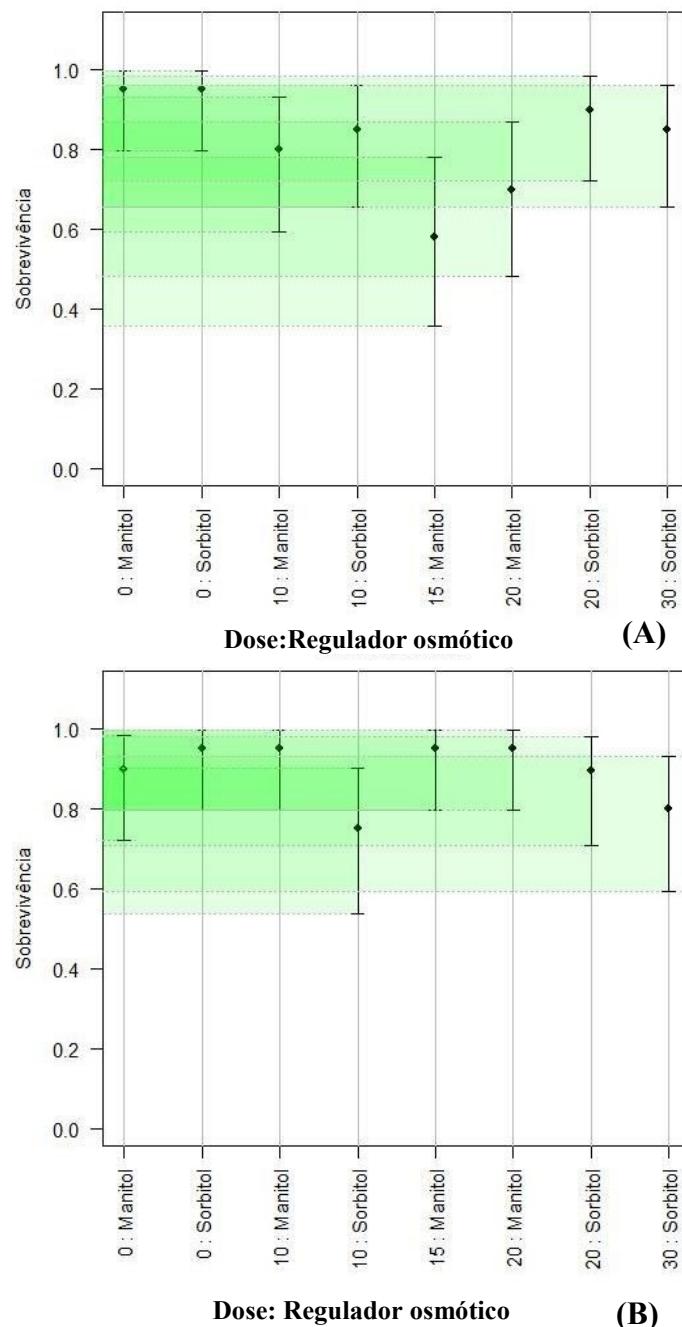


FIGURA 3 – Sobrevivência de explantes de baru na conservação *in vitro* sob temperatura de 18°C (A) e 20°C (B). M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L⁻¹. Urutaí-GO, 2018.

Ao analisar os valores médios (Figura 4) ao final da conservação *in vitro* de barueiro (120 dias), com diferentes concentrações de agentes osmóticos, permite-se a constatação dos níveis de expressão na produção de número de brotos de 2,35 a 1,41 para os tratamentos T1 e T4, com a utilização do manitol para indução de conservação na temperatura de 18°C (Figura 5 A, B, C). Ao se avaliar as médias para o regulador

osmótico sorbitol, nas mesmas condições os valores, apresentam-se entre 2,06 e 1,63 para os tratamentos T3 e T1.

Nesse sentido, Santos et al. (2011), em estudos com conservação *in vitro* de mangabeira do Nordeste, analisando segmentos nodais com brotações adventícias de mangabeira conservados *in vitro* por 120 dias em meio de cultura MS com diferentes combinações de sorbitol (10; 20 e 40 g L⁻¹) e sacarose (0 e 15 g L⁻¹), encontraram valores variando de 3,92 a 4,85 (sorbitol sem adição de sacarose) e valores de 3,32 a 6,90 (sorbitol + sacarose).

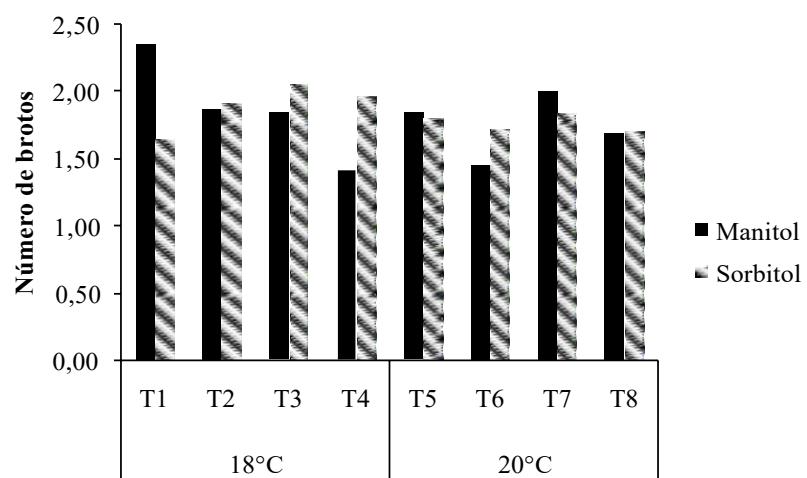


FIGURA 4 – Número de brotos após 120 dias de conservação *in vitro* de barueiro por crescimento lento. Urutá-GO, 2018.

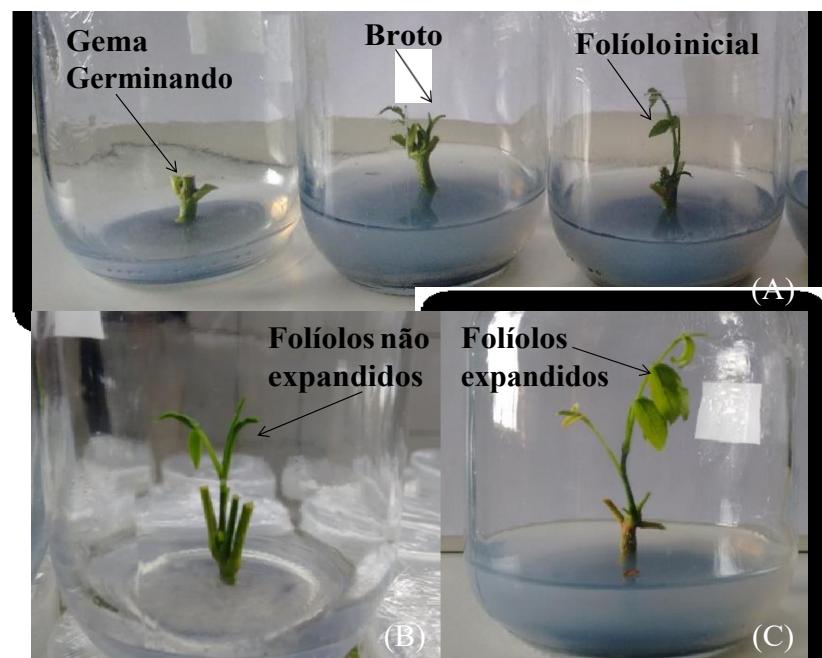
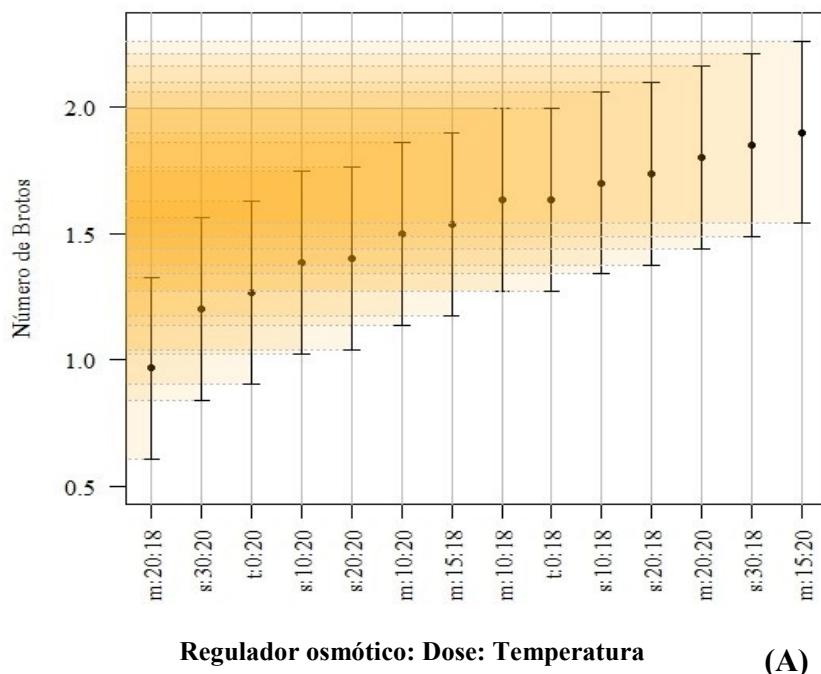


FIGURA 5 – Segmento nodal de barueiro em diferentes fases de desenvolvimento *in vitro* sob temperatura de 18°C e diferentes concentrações de manitol, sob regime de crescimento lento (A, B, C). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutá-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula.

A análise dos dados apresentados na Figura 6 A indica que os açúcares álcoois utilizados como reguladores osmóticos (manitol e sorbitol) tiveram influência significativa na formação de brotos por segmento nodal aos 30 dias de armazenamento, sob baixas temperaturas (18°C e 20°C). Observou-se que a formação de brotos foi menor para o tratamento que contém o agente osmótico manitol na dose de 20 g L⁻¹, na temperatura de 18°C, com 0,4 brotos de média (Figura 6 A).

Decorridos os 45 dias de armazenamento, observou-se que a formação dos brotos não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Figura 6 B). Nesta leitura, todos os tratamentos mantiveram-se viáveis e semelhantes quanto à variável número de brotos.

Segundo constataram Camilo et al. (2009), trabalhando com explantes de algodão do campo aos 30 e aos 60 dias de avaliação *in vitro*, aos 60 dias após a inoculação foi obtida uma média de 4,6 gemas formadas, contra apenas 2,7 gemas aos 30 dias de avaliação. A análise da relação entre o número de gemas formadas e o tempo de avaliação mostrou que, em média, aos 60 dias, o número de gemas formadas foi significativamente maior que aos 30 dias. Os dados obtidos nos primeiros 45 dias de armazenamento são promissores, pois os valores se mantiveram semelhantes ou menores quando comparado com a avaliação anterior (Figura 6 A, B).



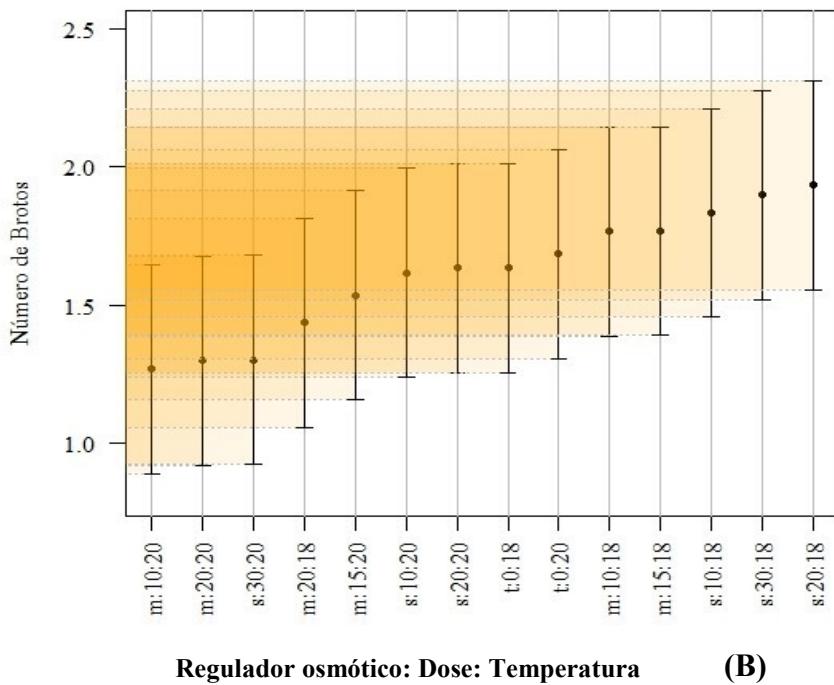


FIGURA 6 – Número de brotos em relação aos tratamentos no decorrer dos 30 (A) e 45 (B) dias de conservação *in vitro* de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. **M:** Manitol; **S:** Sorbitol, dose em g L^{-1} . Urutaí-GO, 2018.

Já aos 60 dias de armazenamento, sob 20°C, o agente osmótico sorbitol na dose de 30 g L^{-1} apresentou menores valores de brotos (1,22) formados (Figura 7 A). Enquanto que aos 90 dias tanto o tratamento contendo manitol na dose de 10 g L^{-1} (1,57 brotos) quanto o tratamento contendo sorbitol na dose de 30 g L^{-1} (1,30 brotos), em conservação a 20 °C, apresentaram menores valores de brotos formados (Figura 7 B). Os acessos mantidos *in vitro* são submetidos a ambientes físico-químicos que diminuem o metabolismo e reduzem o crescimento da planta, sem afetar a viabilidade, possibilitando intervalos maiores entre os subcultivos reduzindo-se assim a mão de obra e o espaço necessários para a conservação. A diminuição da atividade metabólica pode ocorrer pela redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardadores de crescimento ao meio de cultura ou pela diminuição da concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

No presente estudo constata-se que as diferenças significativas podem variar em função das temperaturas, tipos de agentes osmóticos e diferentes concentrações desses agentes. Todavia, esses valores também podem se apresentar estatisticamente iguais e mesmo assim estabelecer protocolos de conservação para essa frutífera que possibilitem a manutenção de barueiro *in vitro* por períodos que podem variar de 30 a 120 dias.

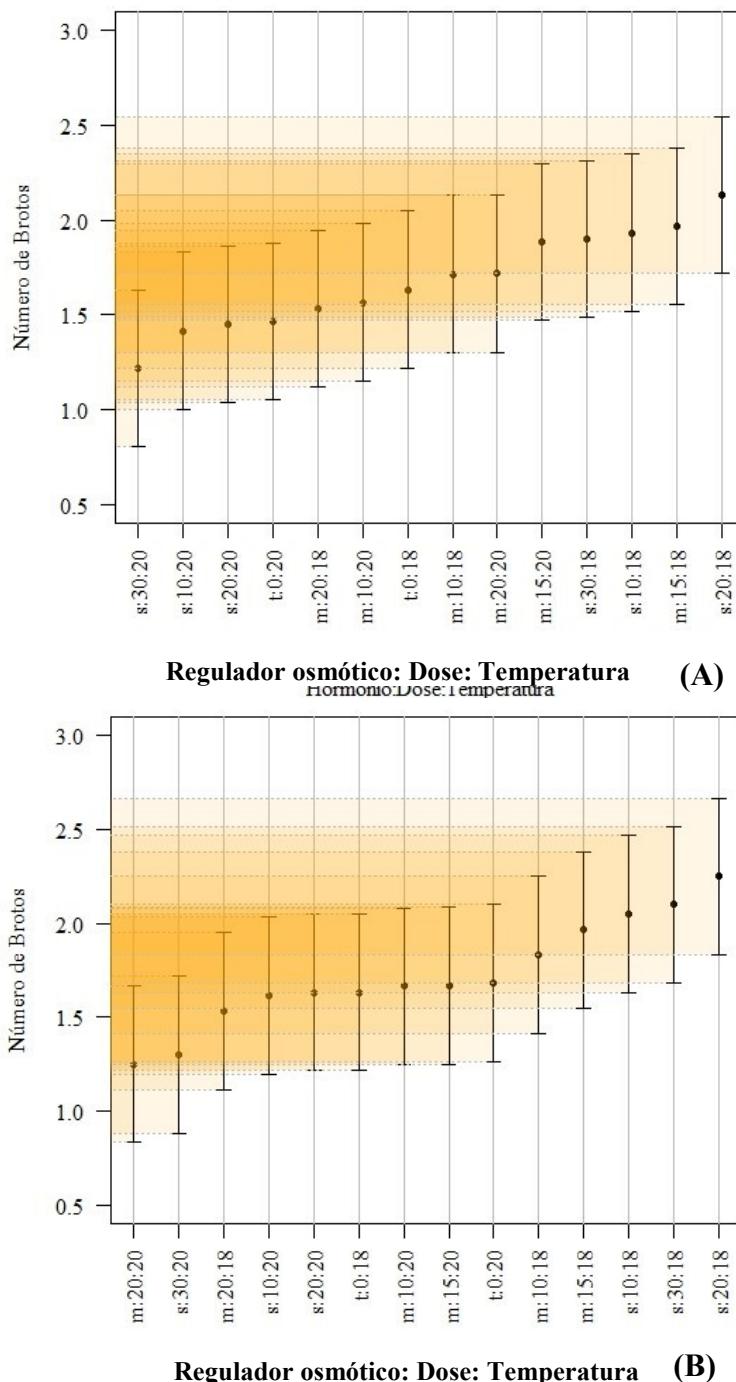


FIGURA 7 – Número de brotos quanto aos tratamentos no decorrer dos 60 (A) e 90 (B) dias de conservação *in vitro* de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L⁻¹. Urutaí-GO, 2018.

Também trabalhando com a conservação *in vitro* de segmentos nodais retirados de *Cochlospermum regium* (algodão-do-campo), um arbusto de ocorrência frequente nas áreas do Cerrado, Caatinga e Pantanal, Camilo et al. (2009) avaliaram essa espécie por 90 dias, sob três regimes de temperatura (10, 20, e 25°C), e em três concentrações de meio WPM (½, ¾ e pleno) e segundo os autores a conservação da espécie *in vitro*

mostrou-se viável a partir do armazenamento em câmara de crescimento a 20°C em meio de cultivo ½WPM. Sob essas condições, os explantes mantiveram um crescimento lento e percentual de sobrevivência de 100%, após três meses de avaliação.

Aos 120 dias de armazenamento não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 8). Essa informação permite a inferência de que o armazenamento neste período de tempo e nas condições testadas não diferenciam nos tratamentos quanto à variável número de brotos, demonstrando que a conservação se encontra estável nessa data de leitura. Lima-Brito et al. (2011) comparando dois tipos de agentes osmóticos, nas duas temperaturas testadas (em câmara do tipo B.O.D. a 18°C e em sala de crescimento a 25±3°C) na conservação *in vitro* de sempre-vivas, não observaram diferenças significativas para comprimento da parte aérea entre os meios suplementados com sacarose e sacarose + sorbitol, tanto na concentração total de 30g L⁻¹ como de 45 g L⁻¹.

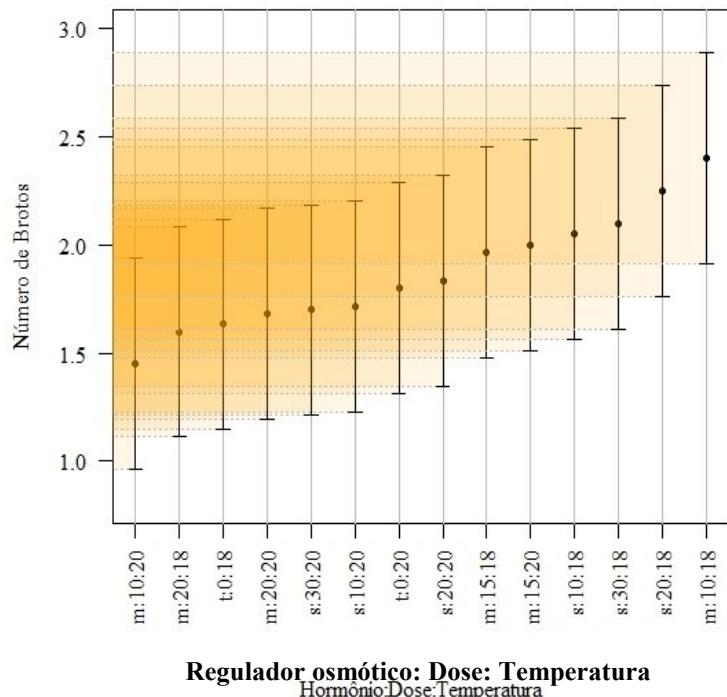


FIGURA 8 – Número de brotos em relação aos tratamentos, aos 120 dias de conservação *in vitro* de barueiro de 18°C e 20°C. **M:** Manitol; **S:** Sorbitol, dose em g L⁻¹. Urutaí-GO, 2018.

Ao se avaliar os brotos formados (Figura 9 A, B) nos tempos estudados (30, 45, 60, 90 e 120) na temperatura de 20°C as médias foram menores no tratamento T8 com a maior dose de sorbitol (30 g L⁻¹) em que as avaliações ficaram em 1,20; 1,30; 1,22; 1,30; 1,70 de brotos formados ao longo dos dias avaliados.

Na temperatura de 18°C, os menores valores médios quanto à formação de brotos ao longo das avaliações também foram verificados na maior concentração de agente osmótico, porém o manitol (T4 - 20 g L⁻¹) como agente osmótico se destacou. Observou-se média de 0,97; 1,43; 1,53; 1,53; 1,60 de brotos formados ao longo dos dias de conservação (30 a 120 dias).



FIGURA 9 – Brotos desenvolvidos a partir de segmento nodal de barueiro, conservados *in vitro* sob temperatura de 20°C e diferentes concentrações de sorbitol, sob regime de crescimento lento (A, B). Laboratório de Biotecnologia. Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí-GO, 2018. Foto: Mariana Silva Pereira de Paula.

Pela abordagem realizada por Lima-Brito et al. (2011) em estudo sobre o efeito de agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *Mucugensis* percebe-se que os segmentos mantidos a 18°C foram superiores aos encontrados a 25°C, para todas as variáveis analisadas (comprimento da parte aérea e da raiz, a porcentagem de folhas verdes, a porcentagem de explantes com brotos, o número de brotos por explante e o comprimento dos brotos). Cabe salientar que esses dados estão corroborando com a presente pesquisa, confirmando que temperaturas baixas são promissoras para a conservação *in vitro* da espécie *D. alata*.

Para as análises dos dados médios de conservação *in vitro* de barueiro (Figura 10), com diferentes concentrações de agentes osmóticos e temperaturas, quanto ao número de folíolos foi de 0,88 para o T4 (20,0 g L⁻¹ de manitol), na temperatura de 18°C. Esse valor é menor que a testemunha T1 (0,0 g L⁻¹ de manitol) na proporção de 4:1, ou seja, a média numérica dos folíolos para o T1 foi de 3,63. Esse efeito é relevante quando se pretende definir padrões de comportamentos na conservação *in vitro* do barueiro, uma vez que a diminuição do número de folíolos, na medida em que há o

aumento do manitol, caracteriza a determinação de um protocolo para manutenção por mais tempo *in vitro* desse recurso genético, que é segmento nodal de barueiro.

Já para o regulador osmótico sorbitol, foi observado crescente aumento nos números de folíolos nos tratamentos T1-1,50; T2-3,86 e T3-4,15 em temperatura de 18°C. Ao se avaliar as médias na temperatura de 20°C, o fenômeno de ganho de folíolo se repete com as médias de T5-4,60; T6-4,95; T7-6,78. Esses valores declinam apenas no T4-3,76 e T8-5,57 para ambas as temperaturas. Todavia, apresentam-se maiores que a testemunha na proporção de 2:1 (T1-1,50; T4-3,76) na temperatura de 18°C. No tratamento com 20°C, o T8 também apresentou proporção menor em relação à testemunha, (T5-4,60; T8-5,57). Resultados contrários aos encontrados neste estudo foram verificados por Santos et al. (2011) com a utilização de sorbitol x sacarose x tempo na conservação *in vitro* com segmentos nodais de mangabeira do Nordeste. Esses autores verificaram que o valor máximo de número de nós encontrado, por meio da derivada da equação, para 20 e 40 g L⁻¹ de sorbitol foi de 6,96 e 4,11 aos 118,6 e 91,5 dias de tempo de cultivo, respectivamente. Essa afirmação evidencia as diferentes manifestações do genótipo x ambiente em determinados padrões de conservação *in vitro*, sendo que para o barueiro os melhores dados para manutenção *in vitro* foram verificados para o manitol a 20 g L⁻¹ em temperatura de 18°C.

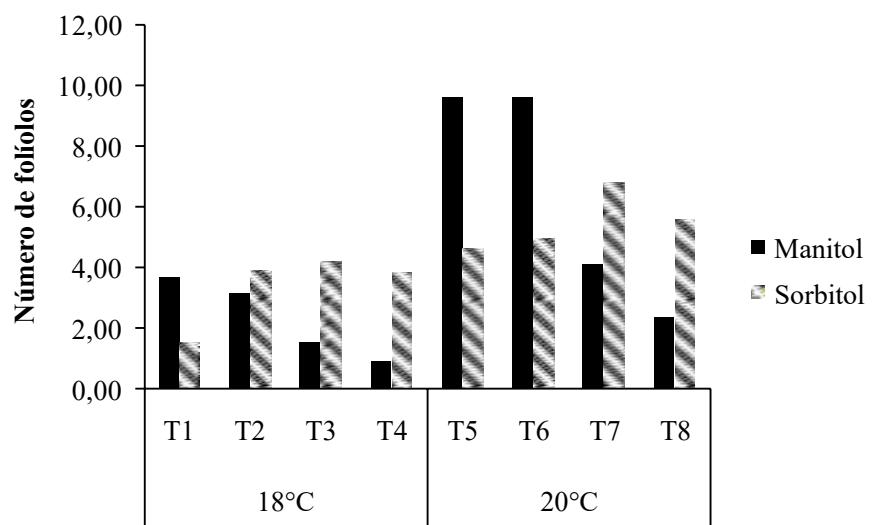


FIGURA 10 – Número de folíolos após 120 dias de conservação *in vitro* de barueiro por crescimento lento. Urutaí-GO, 2018.

Observa-se que o crescimento de folíolos, aos 30 dias (Figura 11 A) e 120 DAI, foi menor nas duas testemunhas, demonstrando que durante este período os agentes

osmóticos já não determinavam o ritmo de desenvolvimento dos explantes estudados, visto que as testemunhas apresentaram valores estatisticamente menores.

Nota-se que o agente osmótico sorbitol, aos 45 DAI, em todos os tratamentos utilizados, com todos armazenados a 20 °C, apresentou maior número de folíolos formados (Figura 11 B). Os dados do presente estudo corroboram com Santos et al. (2011) em estudo com conservação *in vitro* de mangabeira. Esses autores argumentam que as interações sacarose x sorbitol e fatorial x testemunha adicional foram significativas para o número de brotos por segmento nodal e número de nós por brotação adventícia.

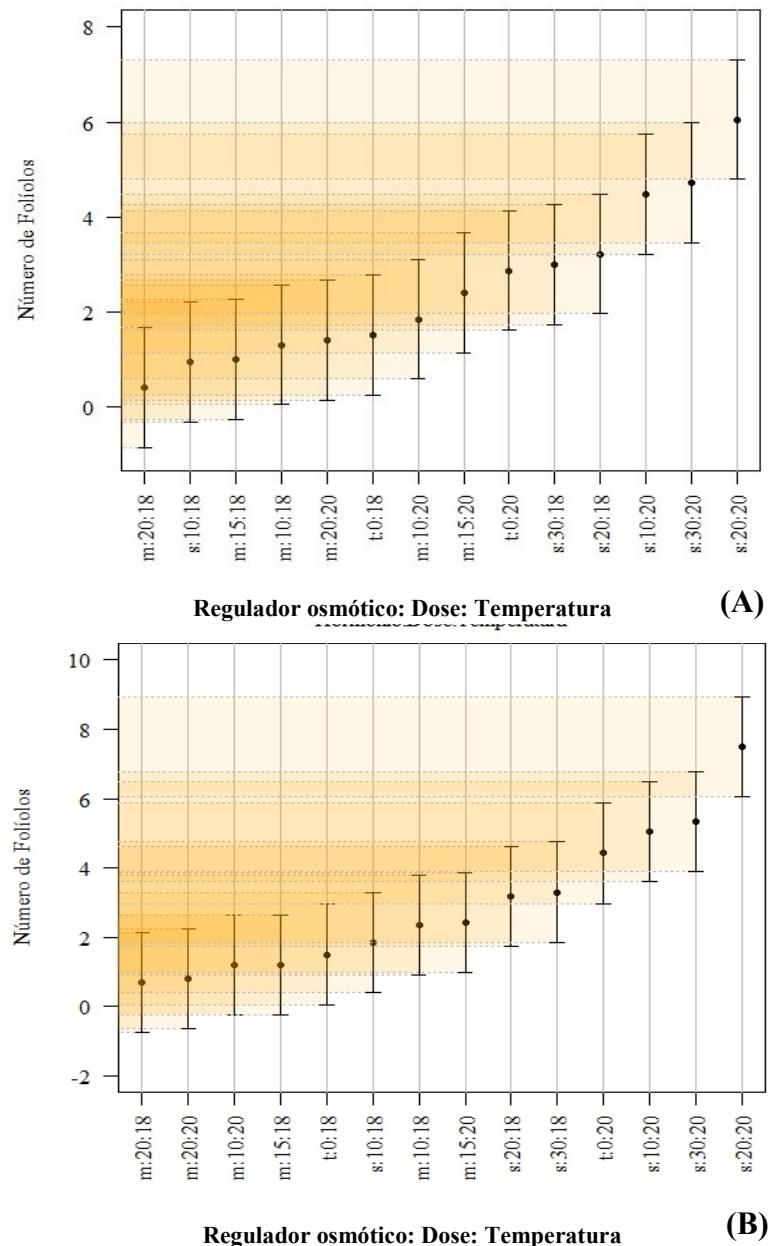


FIGURA 11 – Número de folíolos em relação aos tratamentos no decorrer dos 30 dias (A) e 45 dias (B) de conservação *in vitro* de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. **M:** Manitol; **S:** Sorbitol, dose em g L⁻¹. Urutai-GO, 2018.

Aos 60 dias de armazenamento (Figura 12 A), o agente osmótico manitol nas dosagens de 10 e 20 g L⁻¹, em ambas as temperaturas, obtive menores números de folíolos. O agente osmótico manitol na dosagem de 15 g L⁻¹ e o sorbitol nas doses de 10 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ e a testemunha, armazenados a 18°C, foram os que apresentaram os menores valores quanto ao número de folíolos. Ao se avaliar o tempo de 90 dias após a inoculação (Figura 12 B), constata-se, que o manitol apresentou os menores resultados de número de folíolos em todas as doses observadas nas duas temperaturas testadas.

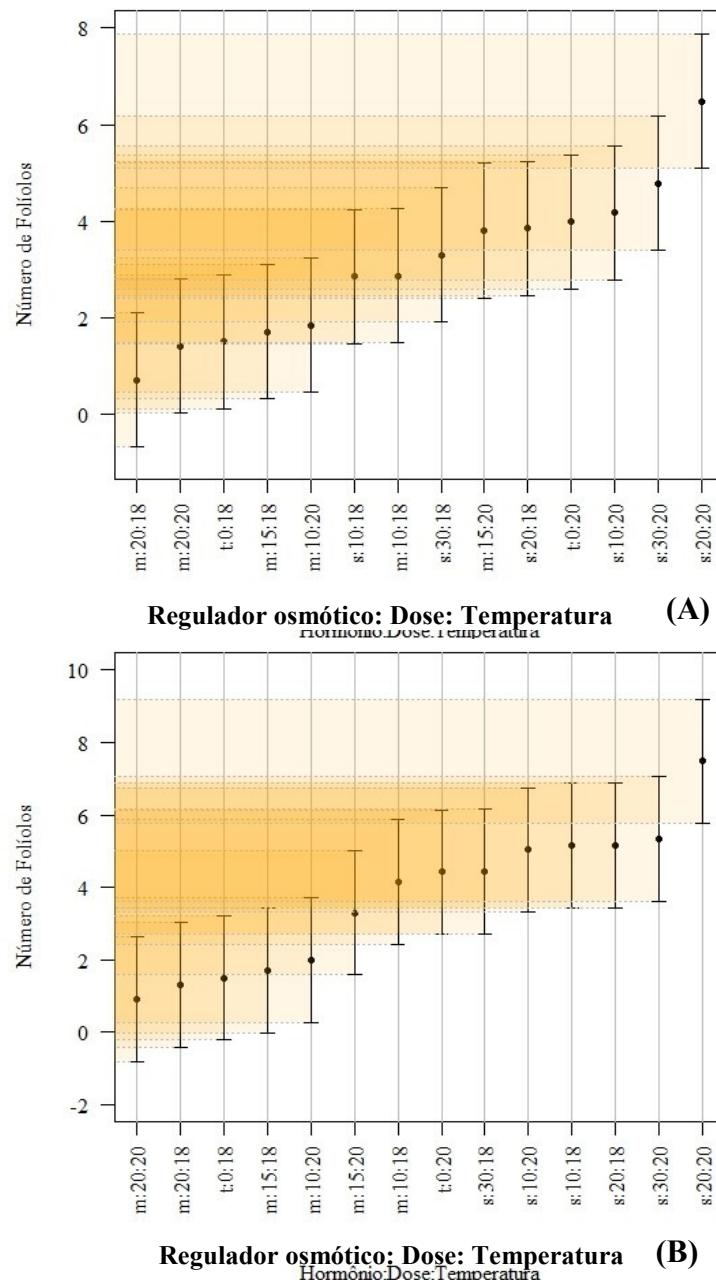


FIGURA 12 – Número de folíolos em relação aos tratamentos no decorrer dos 60 (A) e 90 (B) dias de conservação *in vitro* de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. M: Manitol; S: Sorbitol, dose em g L⁻¹. Urutá-GO, 2018.

Constata-se que mesmo com o uso de reguladores osmóticos os segmentos nodais de *D. alata* desenvolveram-se com os brotos formados apresentando crescimento foliar (folíolos) (Figura 13). Sabe-se que a presença da sacarose no meio de cultivo é fundamental para manter o desenvolvimento dos brotos, já que a sacarose desempenha um papel importante sendo um dissacarídeo não redutor universalmente utilizado como fonte de energia e esqueleto de carbono para plantas mantidas *in vitro*. Esse açúcar promove aumento de biomassa e sua concentração é um fator determinante no crescimento de plantas em condições *in vitro* (ANKITA; ANIMESH, 2013). De fato, outros estudos também relatam que a adição de sacarose tem efeito benéfico no crescimento e desenvolvimento de plantas *in vitro* (FORTES; PEREIRA, 2001; FARIA et al., 2006; FLORES et al., 2013).

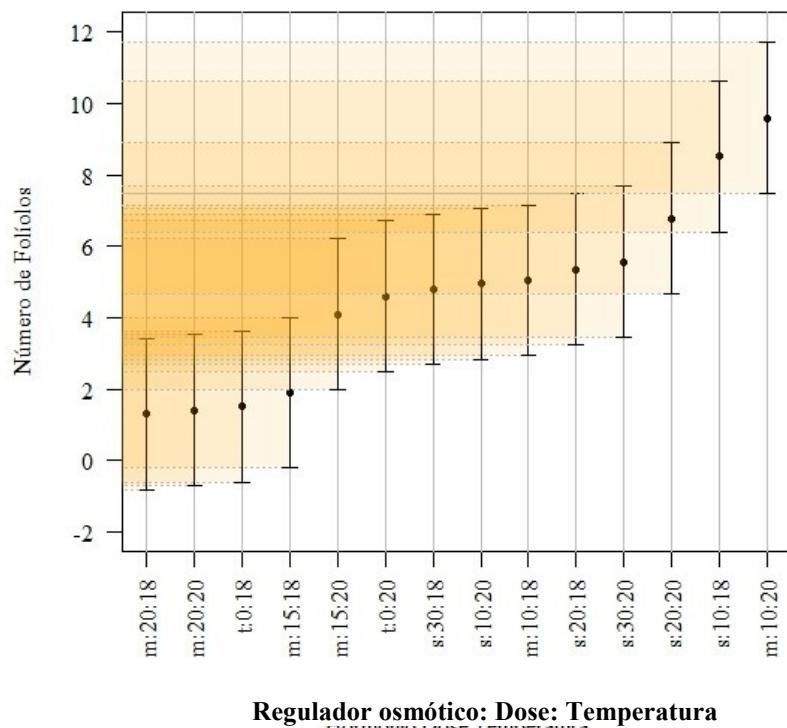


FIGURA 13 – Número de folíolos em relação aos tratamentos no decorrer dos 120 dias de conservação *in vitro* de barueiro nas temperaturas de 18°C e 20°C. **M:** Manitol; **S:** Sorbitol, dose em g L⁻¹. Urutaí-GO, 2018.

Em estudos para o desenvolvimento de um protocolo para conservação *in vitro* de dois genótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown utilizando diferentes reguladores osmóticos (sacarose; manitol; sorbitol) e temperaturas (15°C e 25°C), Santos et al. (2012) observaram a interação entre os genótipos, temperatura e reguladores osmóticos

aos 90 dias de conservação *in vitro*. As melhores médias para ambos os genótipos foram apresentadas nos tratamentos com 30 e 20 g L⁻¹ de sacarose a 15°C e no tratamento com 30 g L⁻¹ de sacarose a 25°C. Os autores ainda ressaltam que, possivelmente por não promover a absorção de água e nutrientes, a adição de manitol e sorbitol no meio de cultura pode ter interferido na sobrevivência dos explantes, provocando assim um elevado estresse osmótico nas plantas.

Foi possível constatar que em todos os tempos (30, 45, 60, 90 e 120) avaliados as médias para o número de folíolos foram menores nos tratamentos com maiores doses de manitol 20 g L⁻¹ em que as avaliações ficaram em 2,30; 2,00; 2,33; 2,25; 2,33 de brotos por tratamento na temperatura de 20°C.

Já para a temperatura de 18°C, nos tempos de 30, 45, 60, 90 e 120, os menores valores médios, quanto ao número de folíolos, ao longo das avaliações também foram verificados nas maiores concentrações do manitol (20 g L⁻¹) como agente osmótico, cujos valores foram de 0,40; 0,70; 0,70; 1,30; 1,30 folíolos em média.

Estudos com agentes osmóticos na conservação *in vitro* de jenipapeiro (LÉDO et al., 2013) apresentaram efeito significativo no comprimento da parte aérea e no número de folhas com abscisão das plântulas aos 90 de cultivo *in vitro*. Todavia, esse efeito foi contrário aos encontrados na presente pesquisa, já que os autores citados constataram que nas concentrações de 0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 g L⁻¹ não foi observado o efeito de aceleração do comprimento da parte aérea com a utilização do manitol. Esse fato reitera a eficiência do protocolo de conservação *in vitro* de barueiro com a utilização do manitol ou sorbitol em diferentes concentrações e temperaturas, como visto neste estudo.

O sorbitol e o manitol são açúcares álcoois que geralmente não são metabolizados pelas plantas e por isso são empregados para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (GEORGE, 1993). Para o barueiro, o manitol mostrou-se mais eficiente que o sorbitol na redução do crescimento das plantas com armazenamento a 18°C assemelhando-se com os resultados obtidos para as espécies de *Solanum tuberosum* L., *Vanilla* sp.; *Cocos nucifera* L. e *H. speciosa* var. *speciosa* do Nordeste (FORTES; PEREIRA, 2001; DIVAKARAN et al., 2006; LÉDO et al., 2007; SANTOS et al., 2011).

Os agentes osmóticos, entre eles o manitol e o sorbitol, ao serem adicionados ao meio de cultura, promovem a remoção do excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, por isso o crescimento da cultura ocorre de forma mais lenta (DUMET et al.,

1993). Estudos desenvolvidos por Machado et al. (2012) argumentam que houve efeito significativo do manitol na redução do crescimento da parte aérea de plântulas do acesso AVG de coqueiro-anão para o crescimento da parte aérea aos 180 e 270 dias de cultivo *in vitro*. O comprimento da parte aérea do acesso AVG apresentou comportamento quadrático em relação às concentrações de manitol aos 180 e 270 dias de cultivo, sendo evidente o seu efeito inibidor do crescimento a partir de 0,2 M, com efeito deletério na concentração de 0,4 M. Essas informações confirmam as constatações da presente pesquisa com o manitol apresentando os menores valores para brotações e número de folíolos para a espécie *D. alata*.

Quanto aos agentes osmóticos e sua utilização no meio de cultura para conservação *in vitro* de material genético, Fortes e Pereira (2001) salientam que, entre os agentes osmóticos, o manitol tem proporcionado bons resultados quanto à restrição do crescimento e desenvolvimento de diversas espécies, sendo assim largamente utilizado na conservação *in vitro*. Resultados obtidos por Silva et al. (2016) demonstram que houve redução da taxa de multiplicação de amoreira-preta em função da presença do manitol no meio de cultura, fato que pode ter ocorrido devido a esse ser um açúcar-álcool que geralmente não é metabolizado pelas plantas e por isso é empregado para a redução do potencial hídrico do meio de cultura e, com isso, promover um estresse osmótico causado pela diminuição na absorção da água e de nutrientes presentes no meio (ARRIGONI-BLANK et al., 2014).

5.2. ETAPA 2: Retomada do crescimento dos segmentos nodais de *D. alata* Vog., conservados *in vitro*;

A retomada de crescimento é um processo importante para definir um protocolo de conservação *in vitro*. É partir desse momento que se constata a eficiência da metodologia empregada na conservação.

Os reguladores osmóticos têm sido bastante usados na conservação *in vitro*, devido à sua capacidade de controlar o potencial osmótico do meio. Esse efeito, entretanto, ainda que reduza o metabolismo das plantas conservadas devido ao déficit hídrico, pode causar um estresse elevado, podendo comprometer a integridade das plantas conservadas. Tendo em vista este problema, é necessário o ajuste de uma concentração ideal, considerando a manutenção da capacidade regenerativa das plantas (MACIA, 2011), pois além da sobrevivência e manutenção de níveis modulados de crescimento, o sucesso da conservação via uso de osmorreguladores para promoção de

crescimento lento está baseado na possibilidade de recuperação do maior número de plantas (SILVA et al., 2016).

Para proporcionar a retomada de crescimento dos segmentos nodais de barueiro (*Dipteryx alata* Vog.) após conservação, a suplementação do meio com variações de 6-benzilaminopurina (BAP) associado com 0,25 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) não observou diferença significativa para os explantes advindos da conservação por crescimento mínimo sob a temperatura de 18°C e 20°C.

O BAP é um regulador de crescimento cuja função é a multiplicação celular (TAIZ; ZEIGER, 2013), sendo umas das citocininas que apresenta melhores resultados na multiplicação de brotos *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Estimulam o crescimento pela expansão mais que pelo alongamento (STOYNOVA et al., 2004). Isso ocorre uma vez que esta citocinina é capaz de promover a quebra da dominância apical e da dormência das gemas laterais culminando, assim, com a formação de novos brotos (GEORGE, 1993; LUIS, 2008). O ANA é uma auxina que atua na expansão e no alongamento celular, promovendo modificações plásticas na parede celular vegetal durante o processo de divisão e aumentando a extensibilidade da célula (KRIKORIAN, 1991), em pequenas concentrações, também têm sido relacionadas a vários outros processos de desenvolvimento vegetal, como o desenvolvimento inicial de brotos (MULLER; LEYSER, 2011).

Segundo Muday et al. (2012) o sucesso desses reguladores depende do balanço entre as concentrações, das interações endógenas e exógenas do explante e da espécie e a relação auxina/citocinina pode ser sinérgica ou antagônica na regulação de vários processos de desenvolvimento, como a formação e o alongamento apical e radicular, além do desenvolvimento de raízes laterais e abscisão foliar. Todavia, as características fisiológicas da espécie *D. alata* em conjunto com a relação auxina/citocinina utilizada e as condições de cultivo quanto à temperatura e aos osmorreguladores utilizados na conservação dos explantes podem ter desfavorecido a indução e formação das brotações nos explantes de barueiro. Esse fato implica em que, aos 35 dias de cultivo, quando foram realizadas as avaliações da retomada do material (que antes estava em estado de conservação por agentes osmóticos) o uso de BAP não foi favorável na multiplicação dos brotos a partir de segmentos nodais de barueiro, não havendo a necessidade de acrescentar a citocinina BAP ao meio de cultura, durante este período de retomada de crescimento.

Outro fator inerente à espécie *D. alata* que pode estar correlacionado com a dificuldade de multiplicação de brotos após conservação *in vitro* por crescimento lento é o fato de o barueiro ser caracterizado como uma planta lenhosa. As plantas lenhosas podem possuir alguns mecanismos que, ao interagirem com o meio, passam a inibir os processos fisiológicos que induziriam ao desenvolvimento da espécie sob a ação de reguladores de crescimento do tipo citocinina e, no caso específico, do BAP.

Sobre a ação desse regulador na micropropagação de lenhosas, Silva et al. (2015), em estudos com *Croton cajucara* Benth, tiveram dificuldades no desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* da espécie, pois o índice de brotação teve um comportamento ascendente na curva de regressão até aproximadamente 1,8 mg L⁻¹ de BAP, e nessa concentração apenas 58,9% das microestacas apresentaram brotação, após 30 dias de cultivo (ponto de máxima eficiência calculada). Após essa concentração, incrementos nos valores de BAP corresponderam à queda nas taxas de brotação. Esses autores também afirmam que nas concentrações 0 e 3 mg L⁻¹ de BAP foi aonde as microestacas apresentaram as menores taxas de brotação. Esses dados reforçam o presente estudo, pois as concentrações de BAP utilizadas (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) não apresentaram diferenças estatísticas, podendo ainda não ser eficientes no estímulo das brotações, assim como o alongamento, caso também observado na presente pesquisa.

Silva et al. (2015) argumentam ainda que para determinadas espécies, sobretudo as lenhosas, quando cultivadas *in vitro*, ao entrarem em crescimento ativo podem dentro de poucas semanas entrarem em fase de senescência e simplesmente pararem a multiplicação, com consequente queda das folhas.

6 CONCLUSÕES

A temperatura de 18°C e o agente osmótico manitol a 20 g L⁻¹ são indicados para a promoção da conservação *in vitro* por crescimento lento para a espécie *D. alata* do Cerrado goiano pelo período de 120 dias;

O sorbitol nas concentrações e temperaturas utilizadas não é recomendado para a conservação *in vitro* de barueiro.

Não houve incremento das características analisadas na retomada de crescimento *in vitro* de barueiro com a utilização de BAP.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ressalta-se que a combinação do uso de reguladores osmóticos em baixas temperaturas visando à conservação *in vitro* de espécies nativas pode ser uma estratégia bem-sucedida em novos estudos a serem realizados, sendo este um dos trabalhos pioneiros que servirá de base principalmente no que diz respeito à conservação *in vitro* de barueiro.

O período de crescimento lento testado durante o experimento foi de 4 meses, sendo visto que a utilização de um regulador osmótico, como o manitol, apresentou as melhores respostas. Sendo assim, há a possibilidade de testar um maior tempo de manutenção *in vitro* (acima de 120 dias), além de possíveis combinações desse regulador osmótico, como a sacarose, como bem visto em outras pesquisas realizadas.

É necessário a realização de novos estudos, com a conservação *in vitro* de barueiro do Cerrado Goiano, visando a manutenção da viabilidade das plantas após o período de incubação. Sugere-se uso de outros reguladores de crescimento que possam interferir no crescimento das plântulas de baru *in vitro* após sua conservação.

8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. F. P. Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e atemóia (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília - DF.

ANKITA, P.; ANIMESH, S. Effects of mannitol, sorbitol and sucrose on growth inhibition and in vitro conservation of germplasm of *Asparagus racemosus* an important medicinal plant. **Medicinal Plants International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v.5. p. 71-74, 2013.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; TAVARES, F. F.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. C.; MENEZES, T. S.; SANTANA, A. D. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 1-7, 2014.

CAMILLO, J. L; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E; VIEIRA, R.F; PEIXOTO, J.R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 184-189, 2009.

DIVAKARAN, M; NIRMAL BABU, K; PETER, K. V. Conservation of Vanilla species *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 02, p. 175-180, 2006.

DUMET, D; ENGELMANN, F; CHABRILLANGE, N; DUVAL, Y; DEREUDDRE, J. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, n. 14, p. 243-250, 1993.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, vol. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FARIA, G. A; COSTA, M. A. P. C; JUNGHANS, T. G; LÉDO, C. A. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FERNANDES, D; FREITAS, J. B; CZEDER, L. P; NAVES, M. M. V; TEIXEIRA, L. Nutritional composition and protein value of the Baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, vol. 9, n. 10, p. 1650-1655, 2012.

FERREIRA, M. E; CALDAS, L. S; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA - SPI/EMBRAPA - CNPH, 1998. 509 p.

FLORES, R; ULIANA, S.C; PIMENTEL, N; GARLET, T. M. B. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199, 2013.

FORTES, R. L; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, 2001.

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

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A. Micropopagation. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, v.1, 1998, p. 99-169.

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

LÉDO, A. S; ALMEIDA, C. S; ARAÚJO, A. G; SILVA, A. V. C; SILVA JUNIOR, J. F. Efeito do manitol no crescimento *in vitro* de acesso de jenipapeiro dos Cerrados para fins de conservação. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 25, I RGVNE, nov. 2013.

LÉDO, A. S; CUNHA, A. O; ARAGÃO, W. M; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento do coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 19, p. 346-351, 2007.

LIMA-BRITO, A. ALBUQUERQUE, M. M. S; ALVIM, B. F. M; RESEND, S. V; BELLINTANI, M. C; SANTANA, J. F. R. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011.

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

MACHADO, C. A; MOURA, C. R. F; LÉDO, A. S; RAMOS, S. R.R; RIBEIRO, F. E. Efeito do Manitol na Conservação *in vitro* de Coqueiro-anão. In: **III CICLO DE PALESTRAS SOBRE CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS**, 2012. Aracaju. **Anais...** Aracaju, 2012.

MACIA, R. J. **Conservação *in vitro* de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA.

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

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

PEDROSO, A. N. V; LAZARINI, R. A. M; TAMAKI, V; NIEVOLA, C. C. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 407-414, 2010.

RIBEIRO, R. A; RODRIHUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do Cerrado. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

ROCA, W. M; MROGINSKY, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**, Cali: CIAT, 1991, p. 41-77.

SANO, S; RIBEIRO, J; BRITO, M. **Baru**: biologia e uso. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 52p. (Série Documentos).

SANTOS, M. C; LÉDO, A. S. LÉDO, C. A. S. SOUZA, F. V. D. SILVA JUNIOR. J. F. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SANTOS, I. T. B. F; PEIXOTO, M. G; MOURA, R. S; SANTOS, M. C; SILVA, J. H. S; FEITOSA, R. B; ARRIGONI-BLANK, M. F; BLANK, A. F. *Conservação in vitro* de dois Genótipos de *Lippia Alba* (Mill E. N. Br). In: ARAÚJO, A. G; LÉDO, A. S. III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas, 2012. Aracaju. **Anais...** Aracaju, SE, Brasil, 2012, p. 95-102. (CD-ROM).

SILVA, D. B; SILVA, J. A; JUNQUEIRA, N. T. V; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 179 p.

SILVA, N. D. G; DUTRA, L. F; BIANCHI, V. J; SOMMEER, L. R; VARGAS, D. P; PETERS, J. A. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: crescimento lento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras - MG, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2016.

SILVA, T. L; PEREIRA, M. A. A; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Propagação *in vitro* de sacaca (*Croton cajucara* Benth.): entendimentos sobre a dificuldade no desenvolvimento de protocolos de micropopulação da espécie. **Biotemas**, v. 28, n. 4, p. 41-50, 2015.

SILVA, T. L; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In Vitro Conservation of Piper aduncum and Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 384-389, 2011.

STOYNOVA-BAKALOVA, E; KARANOV, E; PETROV, P; HALL, M. A. Cell division and cell expansion in cotyledons of *Arabidopsis* seedlings. **New Physiologist**, v. 162, p. 471-479, 2004.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Artmed, 2013. 918 p.

WITHERS, L. A; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998, v.1, p. 297-330.