

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INDUÇÃO DE RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS EM  
*Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) E ANÁLISE  
DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES**

Luciana Nogueira Londe

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Garcia de Santana

Uberlândia

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INDUÇÃO DE RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS EM  
*Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) E ANÁLISE  
DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES**

Luciana Nogueira Londe

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Garcia de Santana

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

Uberlândia – MG

2005

L847i Londe, Luciana Nogueira, 1979-  
Indução de respostas morfogenéticas em *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae) e análise da divergência genética entre populações / Luciana Nogueira Londe. - Uberlândia, 2005.  
140f. : il.  
Orientador: Ana Maria Bonetti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.  
1. Cajuí - Teses. 2. Cajuí - Propagação *in vitro* - Teses. 3. Anacardiaceae - Teses. 4. Polimorfismo - Genética - Teses. 5. Cajuí - Doenças e pragas - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:

634.44 (043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**INDUÇÃO DE RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS EM  
*Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) E ANÁLISE  
DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES**

Luciana Nogueira Londe

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: Prof. Dr. Milton Coelho  
Examinadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Bonetti  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Lúcia Carneiro Vieira  
Prof. Dr. Berildo de Melo

Data da defesa: 07/10/2005

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

---

Ana Maria Bonetti

Uberlândia, 26/10/2005



Árvore  
antiga  
e  
monumental  
do  
Parque  
Nacional  
de  
S. Jacinto

Árvore  
antiga  
e  
monumental  
do  
Parque  
Nacional  
de  
S. Jacinto

Maior cajueiro do mundo, cajueiro de Pirangi (*Anacardium occidentale* , ANACARDIACEA). Parnamirim – RN – Brasil.

### **DADOS MORFOLÓGICOS DE SEUS ÓRGÃOS**

- a) Raiz: pivotante
- b) Caule: tronco lenhoso, com resina, muito tanino.
- c) Folhas: simples de forma oblonga ovadas
- d) Flores: pequenas, lilás
- e) Fruto: castanha e a parte succulenta, denominada de pseudofruto
- f) Semente: rica em óleo, gorduras. Muito apreciada pelo seu sabor e como produto de exploração agrícola

### **HABITAT**

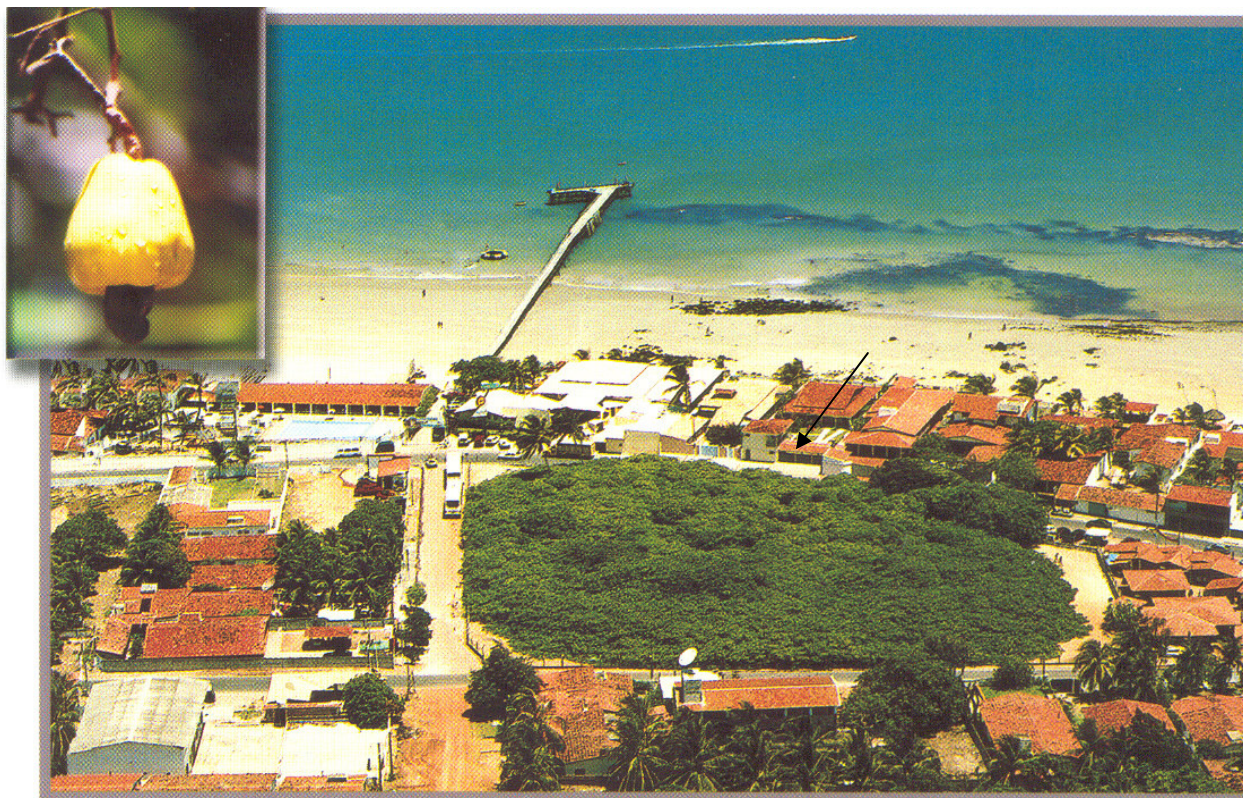
Origem brasileira, porém cultivada em todos os países de clima tropical. O Nordeste brasileiro é onde se concentra o maior cultivo dessa planta devido suportar bem a falta de chuva e não exigir solos ricos em nutrientes.

### **CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS**

Este indivíduo emite de seu caule principal, ramos que ao invés de subirem como é o normal nos outros vegetais, procuram o solo como se fossem raízes. Em seguida ao passar pelo solo, estes ramos formam um sistema radicular com o objetivo de alimentar o novo cajueiro que está se formando da planta matriz. Existe entre a planta mãe e seus filhos verdadeira simbiose, para sobreviverem, um ajuda o outro.

### **DADOS MORFOMÉTRICOS**

Sua copa mede, hoje 8400 metros quadrados, o que corresponde a um agregado de 70 (setenta) cajueiros de porte natural. A idade aproximadamente da planta mãe é de 110 a 120 anos.



*Cajueiro de Pirangi*  
*o maior do mundo*  
*Parnamirim - RN - Brasil*

Cajueiro de Pirangi em Parnamirim – RN. Vista aérea da copa de 8400 metros quadrados (seta).



*Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae) (seta) de porte rasteiro. Para resistir a secas prolongadas, o caule subterrâneo (seta) tem a particularidade de armazenar água.

*Dedico*

*A meus pais, Anésio e Regina, irmãos,  
Fernanda e Marcelo e à princesinha  
Mariana. Obrigada por estarem a  
meu lado em mais uma conquista.*

## *Agradecimentos*

*A Deus por me guiar pelos caminhos já percorridos e aqueles em que ainda caminharei.*

*À minha família. O amor, apoio e confiança que depositam em mim, me faz ser a pessoa que sou hoje.*

*A Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti pelo apoio e orientação.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Garcia de Santana pela confiança, amizade e co-orientação.*

*Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr por ceder o laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e materiais para a condução dos experimentos.*

*À Elisângela, Cristina, Carlos, Flávia e Maristela pelo companheirismo na realização do trabalho.*

*Aos demais estagiários do Laboratório de Genética e do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais que com o passar do tempo se mostraram grandes colegas e amigos.*

*À Tia Ruth, Tamara e Bruno pelo auxílio na coleta dos frutos de cajuí.*

*Ao CENARGEN – EMBRAPA (Bahia) por ter cedido o material para a realização do experimento.*

*A CAPES pela concessão de Bolsa de Mestrado e pelo financiamento de material de consumo.*

## SUMÁRIO

|                  |   |
|------------------|---|
| Lista de Figuras | i |
| Lista de Tabelas | v |
| Resumo Geral     | 1 |
| Introdução Geral | 2 |
| Objetivos gerais | 7 |

## CAPÍTULO I

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução                                                                                                                               | 9  |
| 1.1. Cultura de Tecidos                                                                                                                     | 9  |
| 2. Resumo                                                                                                                                   | 12 |
| 3. Abstract                                                                                                                                 | 13 |
| 4. Objetivos                                                                                                                                | 14 |
| 5. Material e Métodos                                                                                                                       | 15 |
| 5.1. Áreas de coleta                                                                                                                        | 15 |
| 5.1.1. Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia                                                                                             | 15 |
| 5.1.2. Parque Estadual da Serra e Caldas                                                                                                    | 16 |
| 5.1.3. Luiz Eduardo Magalhães                                                                                                               | 16 |
| 5.2. Cultura de tecidos                                                                                                                     | 17 |
| 5.2.1. Desinfestação de explantes de <i>Anacardium humile</i> St. Hill.                                                                     | 17 |
| 5.3. Condições de crescimento <i>in vitro</i>                                                                                               | 24 |
| 5.4. Frutos de <i>Anacardium humile</i> St. Hill. (ANACARDIACEAE)                                                                           | 25 |
| 5.4.1. Germinação e estabelecimento <i>in vitro</i> dos frutos                                                                              | 25 |
| 5.4.2. Inoculação de cotilédones                                                                                                            | 26 |
| 5.4.3. Repicagem das brotações                                                                                                              | 27 |
| 6. Caracteres avaliados                                                                                                                     | 27 |
| 7. Condições de crescimento <i>in vitro</i>                                                                                                 | 28 |
| 8. Análises estatísticas                                                                                                                    | 29 |
| 9. Resultados e Discussão                                                                                                                   | 30 |
| 9.1. Cultura de tecidos                                                                                                                     | 30 |
| 9.1.1. Desinfestação de explantes                                                                                                           | 30 |
| 9.2. Indução de respostas morfogênéticas de <i>A. humile</i> St. Hill. (ANACARDIACEAE) a partir de frutos doados pela EMBRAPA-CENARGEN (BA) | 37 |
| 9.2.1. Indução de respostas morfogênéticas a partir de explantes foliares                                                                   | 34 |
| 9.2.1.1. Calosidade                                                                                                                         | 36 |
| 9.2.1.2. Contaminação                                                                                                                       | 40 |
| 9.2.1.3. Oxidação                                                                                                                           | 42 |
| 9.2.1.4. Número de brotações                                                                                                                | 46 |
| 9.2.1.5. Comprimento das brotações                                                                                                          | 49 |
| 9.3. Indução de morfogênese a partir de explantes cotiledonares                                                                             | 53 |
| 9.4. Subcultivo das brotações, calos e cotilédones obtidos na                                                                               | 60 |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| cultura de tecidos de <i>Anacardium humile</i> |    |
| 9.4.1. Formação de calos                       | 61 |
| 9.4.2. Contaminação                            | 62 |
| 9.4.3. Oxidação                                | 63 |
| 9.4.4. Número de brotos                        | 64 |
| 9.4.5. Comprimento de brotos                   | 66 |
| 9.6. Subcultivo do cotilédone                  | 67 |
| 10. Conclusões                                 | 69 |

## **CAPÍTULO II**

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 1. Introdução                             | 72 |
| 1.1. A contaminação na cultura de tecidos | 72 |
| 1.2. Benomyl                              | 73 |
| 2. Resumo                                 | 75 |
| 3. Abstract                               | 76 |
| 4. Objetivo                               | 77 |
| 5. Material e Métodos                     | 78 |
| 6. Resultados e Discussão                 | 80 |
| 7. Conclusões                             | 87 |

## **CAPÍTULO III**

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introdução                                                        | 89  |
| 2. Resumo                                                            | 95  |
| 3. Abstract                                                          | 96  |
| 4. Objetivos                                                         | 97  |
| 5. Material e Métodos                                                | 98  |
| 5.1. Material Biológico                                              | 98  |
| 5.1.1. Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia - MG                 | 98  |
| 5.1.2. Parque Estadual da Serra de Caldas - GO                       | 98  |
| 5.2. Extração de DNA da folha do cajuí                               | 99  |
| 5.3. Quantificação e qualificação do DNA                             | 100 |
| 5.4. Reação de AFLP                                                  | 100 |
| 5.4.1. Reações de Restrição                                          | 100 |
| 5.4.2. Ligaçao dos adaptadores                                       | 101 |
| 5.4.3. Reação de pré-amplificação                                    | 101 |
| 5.4.4. Amplificação seletiva                                         | 102 |
| 5.5. Visualização dos produtos amplificados                          | 102 |
| 5.6. Análise dos dados                                               | 102 |
| 5.7. Análise foliar de micronutrientes                               | 103 |
| 5.8. Análise do solo                                                 | 103 |
| 6. Resultados e Discussão                                            | 104 |
| 6.1. Extração de DNA de folhas de <i>Anacardium humile</i> St. Hill. | 104 |
| 6.2. Análise molecular                                               | 105 |
| 7. Conclusões                                                        | 115 |

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| Conclusões Gerais                 | 116 |
| Referências Bibliográficas Gerais | 119 |

## LISTA DE FIGURAS

Maior cajueiro do mundo, cajueiro de Pirangi (*Anacardium occidentale* , ANACARDIACEA). Parnamirim – RN – Brasil. a

Cajueiro de Pirangi em Parnamirim – RN. Vista aérea da copa de 8400 metros quadrados (seta). b

*Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae) de porte rasteiro. Para resistir a secas prolongadas, o caule subterrâneo tem a particularidade de armazenar água. c

## CAPÍTULO I

**Figura 1:** Matrizes de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) (seta) utilizadas na seleção de explantes para o cultivo *in vitro*. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 18

**Figura 2:** Explante foliar (seta) de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) inoculado em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 18

**Figura 3:** Semente de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) coletada no Parque Estadual da Serra de Caldas, Caldas Nova – Goiás, 2005. 22

**Figura 4:** Cotilédones (setas) de sementes de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2005. 23

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 5:</b> Inoculação de eixo embrionário e cotilédones de <i>Anacardium humile</i> St. Hill. (ANACARDIACEAE) nas posições abaxial e adaxial. UFU - Uberlândia, MG – 2005.                                                                                                                                                                                    | 23 |
| <b>Figura 6:</b> Plântulas germinadas a partir de sementes de <i>Anacardium humile</i> St. Hill. (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2005.                                                                                                                                                                                                                      | 25 |
| <b>Figura 7:</b> Brotos de <i>Anacardium humile</i> St. Hill. (ANACARDIACEAE) (seta) formados em meio MS suplementado de 5,0 mg L <sup>-1</sup> de BAP aos 30 dias de estabelecimento <i>in vitro</i> . UFU - Uberlândia, MG – 2005.                                                                                                                                | 28 |
| <b>Figura 8:</b> Contaminação e oxidação de segmentos foliares no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Anacardium humile</i> St. Hill. (ANACARDIACEA) submetidas a desinfestação com álcool 70% por 30 minutos e hipoclorito de sódio por 15 minutos a 1% (1); 1,5% (2) e 2,0% (3). UFU - Uberlândia, MG – 2005.                                                           | 31 |
| <b>Figura 9:</b> Contaminação e oxidação de explantes caulinares no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Anacardium humile</i> St. Hill. (ANACARDIACEA) submetidas a desinfestação com álcool 70% por 30 minutos e hipoclorito de sódio 1,0% por 10 minutos (1); 1,0% por 15 minutos (2); 2,0% por 10 minutos (3) e 2,0 % por 15 minutos (4). UFU - Uberlândia, MG – 2005. | 31 |
| <b>Figura 10:</b> Regressão para o número médio de calos formados no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Anacardium humile</i> St. Hill. (ANACARDIACEAE) em meio MS sob a ação de diferentes concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). UFU - Uberlândia, MG – 2005.                                                                                           | 37 |

**Figura 11:** Regressão para o número médio de explantes contaminados, aos 30 e 45 dias do cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) em meio MS sob ação de diferentes concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). UFU - Uberlândia, MG – 2005. 40

**Figura 12:** Regressão para o número de brotações de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE) formados em meio MS variando-se as concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) aos 45 dias de estabelecimento *in vitro*. UFU – Uberlândia, MG. 2005. 48

**Figura 13:** Regressão para o comprimento das brotações (cm) de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE) em meio MS variando-se as concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) aos 30 e 45 dias de estabelecimento *in vitro*. UFU – Uberlândia, MG. 2005. 50

**Figura 14:** Cotilédones de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) inoculados nas posições adaxial e abaxial em meio MS sob ação dos níveis de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 53

## CAPÍTULO II

**Figura 1:** *Aspergillus niger* em meio MS no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) (seta), visto em microscópio óptico (NIKON), aumento de 100x. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 80

**Figura 2:** Fungos em meio MS no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE). Foto em câmera digital (SONY). UFU - Uberlândia, MG – 2005. 81

**Figura 3:** Regressão para o crescimento de *Aspergillus niger* em meio MS com variadas concentrações de fungicida sistêmico benomyl para cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

### **CAPÍTULO III**

**Figura 1:** Amplificação de DNA em PCR para AFLP. Gel de poliacrilamida 8%, coloração com prata.

**FIGURA 2:** Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre 4 genótipos utilizando 16 *primers*. UC: Uberlândia/ Clube Caça e Pesca Itororó – folha coriácea; UP: Uberlândia/ Clube Caça e Pesca Itororó – folha pilosa; CC: Caldas Novas/ Parque Estadual da Serra de Caldas Novas – folha coriácea; CP: Caldas Novas/ Parque Estadual da Serra de Caldas Novas – folha pilosa.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1:** Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog 100% (1962) para a cultura de tecidos de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE). 19

**Tabela 2:** Resumo da análise de variância para as características oxidação, contaminação e calosidade aos 30 e 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 35

**Tabela 3:** Resumo da análise de variância para as características número e comprimento das brotações aos 30 e 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 36

**Tabela 4:** Média dos calos aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 38

**Tabela 5:** Média dos calos aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* e St. Hil. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP)em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 39

**Tabela 6:** Médias do número de explantes contaminados aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hil. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação dos níveis de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP)em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 41

**Tabela 7:** Média do número de explantes contaminados aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hil. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação dos níveis de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP)em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 42

**Tabela 8:** Média do número de explantes oxidados aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 43

**Tabela 9:** Média do número de explantes oxidados aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP)em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 44

**Tabela 10:** Média do número de brotações aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 46

**Tabela 11:** Média do número de brotações aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 47

**Tabela 12:** Média do comprimento das brotações aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 51

**Tabela 13:** Média do comprimento das brotações aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 51

**Tabela 14:** Resumo da análise de variância para as características número e comprimento de raízes e intumescimento dos cotilédones aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6 - benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 54

**Tabela 15:** Média do intumescimento dos cotilédones aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 55

**Tabela 16:** Média do número de raízes formadas aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 56

**Tabela 17:** Média do comprimento das raízes crescidas aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS sob ação das concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 56

**Tabela 18:** Resumo da análise de variância para as características oxidação, contaminação, calosidade, número e comprimento de brotações aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS 50 e 100% sob ação das concentrações 6 - benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 60

**Tabela19:** Médias do número de calos formados aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS 50 e 100% sob ação das concentrações de 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 61

**Tabela 20:** Médias do número de explantes contaminados aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA) em meio MS 50 e 100% sob ação das concentrações de 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 62

**Tabela 21:** Média do número de explantes oxidados aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hil. (ANACARDIACEA) em meio MS 50 e 100% sob ação das concentrações de 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 63

**Tabela 22:** Média do número de brotações aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hil. (ANACARDIACEA) em meio MS 50 e 100% sob ação das concentrações de 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 64

**Tabela 23:** Média do comprimento das brotações aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hil. (ANACARDIACEA) em meio MS 50 e 100% sob ação das concentrações de 6- benzilaminopurina (BAP) em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005. 66

## CAPÍTULO II

**Tabela 1:** Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog 100% (1962) para inoculação de fungos saprófitas e *Aspergillus niger*. 79

**Tabela 2:** Análise de variância para as concentrações de benomyl suplementados em meio MS para o controle do crescimento de fungos saprófitas e *Aspergillus niger* no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2005. 82

**Tabela 3:** Ocorrência de fungos saprófitas e *Aspergillus niger* em meio MS sob ação de benomyl (benlate) no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hil. (ANACARDIACEA). UFU - Uberlândia, MG – 2005. 83

### CAPÍTULO III

**Tabela 1:** *Primers* utilizados na reação de pré-amplificação de AFLP. UFU, Uberlândia – MG, 2005. 100

**Tabela 2:** *Primers* utilizados e número de bandas polimórficas e monomórficas geradas na análise. UFU, Uberlândia - MG, 2005. 104

**Tabela 3:** Análise foliar de micronutrientes de *Anacardium humile* St. Hill. provenientes do Clube Itororó Caça e Pesca (MG) e do Parque Estadual da Serra de Caldas (GO). N – Digestão sulfúrica; P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn – Digestão Nitro Perclórico; B – Colorimétrico Azometina –H 109

**Tabela 4:** Análise da textura de solos do cerrado mineiro e goiano 111

**Tabela 5:** ANÁLISE QUÍMICA DE MICRONUTRIENTES EM SOLOS  
B – BaCl<sub>2</sub> a 0,125% à quente; Cu, Fe, Mg, Zn – DTPA 0,005M + CaCl 0,01M + TEA 0,1M a pH 7,3; S-SO<sub>4</sub> – Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,01 mol/L 112

**Tabela 6:** ANÁLISE DE SOLO. P, K – HCl 0,05N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025N; Al, Ca, Mg – KCl 1N; M.O. – Walkley – Black; SB – soma de bases; t – CTC efetiva; T – CTC a pH 7,0; V – Sat. Por bases; m – Sat por Al.

113

## RESUMO GERAL

O *Anacardium humile* St. Hill., conhecido como cajuzinho-do-cerrado ou cajuí, é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae que ocorre naturalmente em Campo Sujo e no Cerrado do Brasil. Tem importância alimentar, industrial, medicinal e econômica e a castanha tem as mesmas características e usos do cajuí comum, com ampla utilização para o consumo. Pelo fato das espécies do Cerrado mostrarem interesses antagônicos, biológico e socioeconômico, torna-se necessário gerar informações biológicas, na tentativa de uma adequada exploração econômica, para evitar a utilização predatória ou, até mesmo, a extinção da espécie. O objetivo desse trabalho foi o de otimizar um protocolo para cultivo em escala comercial, por micropropagação de *Anacardium humile*, além de analisar os patógenos existentes no cultivo *in vitro*, para quantificar a melhor concentração de fungicida sistêmico a ser utilizado na cultura de cajuí. Foi analisada, ainda, a divergência genética existente entre populações do cerrado mineiro (Clube Caça e Pesca Itororó – Uberlândia – MG) e goiano (Parque Estadual da Serra de Caldas – Caldas Novas - GO) por meio da técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Ocorreu baixo sucesso de micropropagação de cajuí apesar de se obter brotos, que não puderam ser aclimatados. A análise de microrganismos mostrou prevalência de *Aspergillus niger* no cultivo *in vitro* sendo que as concentrações utilizadas de benomyl no meio foram muito elevadas, podendo causar fitotoxicidade às plântulas. Quanto à análise da divergência genética verificou-se maior distância genética entre populações de regiões diferentes (58%) do que dentro da mesma região (35% Clube Caça e Pesca Itororó; 47% Parque Estadual da Serra de Caldas) apesar de as plantas apresentarem características fenotípicas distintas.

## INTRODUÇÃO GERAL

A rápida expansão da fronteira agrícola no Cerrado brasileiro, associada às construções de expressivo impacto ambiental, como usinas hidrelétricas, vêm acelerando o processo de perda da biodiversidade. É necessário, na mesma proporção, dar ênfase às pesquisas de diversidade vegetal nesse Bioma, considerando o potencial de regeneração, uso medicinal e capacidade de adaptação, apresentados pela maioria de suas espécies (Kageyama, 1994).

O Brasil ocupa o primeiro lugar entre os países megadiversos, fruto de sua extensão territorial e posição geográfica. Estima-se que o País possua entre 15% e 20% dos 1,5 milhões de espécies descritas na Terra (Biodiversidade..., 2002). O Ministério do Meio Ambiente (MMA) estimou em 1,87 milhões, o número total de espécies no Brasil, com apenas 202,5 mil delas conhecidas atualmente (Mancin, 2002).

O Cerrado, apesar de toda a potencialidade de uso de sua biodiversidade, é uma das 25 áreas do mundo consideradas críticas para a conservação, devido à riqueza biológica e alta pressão antrópica (Biodiversidade..., 2002).

Muitas espécies nativas importantes como produtoras de madeira, resinas, látex, produtos medicinais e outros são, também, importantes fornecedoras de frutos comestíveis, o que, por um lado confere maior importância e por outro, as tornam mais susceptíveis à destruição, na medida em que nelas se procuram produtos comercialmente mais valiosos que os frutos. Ainda, segundo o autor, a fruticultura tropical deve ser avaliada como um componente muito valioso da conservação dos recursos e como suporte indispensável para a manutenção da vida. Os modelos tão recomendados de agricultura sustentável, dos quais se procura obter uma produção agrícola compatível com a manutenção dos recursos e garantia do futuro das gerações, são mais facilmente colocados em prática recorrendo às culturas perenes, onde se inclui a maior parte das espécies produtoras de frutos comestíveis. Elas protegem o terreno da ação direta do sol e do efeito erosivo das águas e dos ventos e conservam a fertilidade à custa da reciclagem de água e elementos minerais que,

sem elas, ficariam afastados das camadas onde normalmente se desenvolve o sistema radicular da maioria das plantas cultivadas (Ferrão, 1999).

Conhecer o mercado internacional vem sendo um desafio para os produtores brasileiros de frutas frescas que visam esse tipo de comercialização. O Brasil, em função de suas condições climáticas, apresenta potencial para se tornar um dos maiores pólos produtivos de frutas frescas para o mercado mundial, aproveitando a onda naturalista que o mundo atravessa (Nachreiner *et al.*, 2004). O setor frutícola tem sido um importante representante do segmento agrícola no cenário internacional. Só em 2003, as exportações aumentaram 39,1% em comparação com 2002 ([www.brazilianfruit.org](http://www.brazilianfruit.org)).

Atualmente, o País produz cerca de 38 milhões de toneladas de frutas por ano. O setor emprega mais de 5 milhões de pessoas e ocupa uma área de 3,4 milhões de hectares. Segundo o Ministério da Agricultura, a produção de frutas permite obter um faturamento bruto entre 1 e 20 mil reais por hectare ([www.brazilianfruit.org](http://www.brazilianfruit.org)).

Por essas razões e, também, pelo potencial de geração de emprego e renda que possui, o setor é considerado estratégico para o país. O objetivo é realizar programas na área de sanidade, de modernização do processo de produção e de marketing internacional. A grande meta do setor brasileiro é consolidar-se no mercado internacional não apenas como produtor de frutas tropicais mas, também, de outras frutas-chave. Para isso é preciso capacitar o setor e expandir, significativamente, suas fronteiras agrícolas em valores absolutos e, comparativamente, aos grandes supridores internacionais, sem deixar de lado a imagem de confiabilidade, continuidade e diversidade de frutas (GazetaMercantil,2003).

Dentre os frutos nativos do cerrado, destaca-se o *Anacardium humile* St. Hill., conhecido como cajuzinho-do-cerrado ou cajuí, que é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae de ocorrência natural em Campo Sujo e no Cerrado do Brasil, distribuído na Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo e Tocantins. A espécie possui outras denominações, tais como,

cajú, cajueiro-do-campo, caju-de-árvore-do-cerrado e cajuhy (López-Naranjo & Pernía, 1990; CEMIG, 2001).

Nativo do Brasil, o cajuzinho-do-cerrado é um arbusto pequeno com até 80 cm de altura e lenhoso, sendo uma planta melífera e heliófila. Para resistir secas prolongadas, o caule subterrâneo tem a particularidade de armazenar água (Almeida *et al.*, 1998).

No cerrado, onde o solo não oferece maior resistência à penetração de raízes e o nível freático alcança uma profundidade de, aproximadamente, 18 metros (Rawittscher & Col, 1943; Schubart & Rawittscher, 1950), o cajuí alcança enorme desenvolvimento lateral, tanto que uma só espécie pode desenvolver copa circular de, aproximadamente, 16 m de diâmetro (López-Naranjo, 1977) formando extensas touceiras abertas devido ao sistema subterrâneo (xilopódio) ser bem desenvolvido. As folhas são alternas, simples, pecioladas a subsésseis, sem estípulas, possuindo limbo com 6 a 19,5 x 3,5 a 9 cm, pergaminoso a coriáceo com nervuras secundárias e terciárias muito visíveis e elevadas, nas duas faces, com pecíolo de 2 a 15 cm de comprimento. As inflorescências ramificadas (panículas) estão na ponta dos ramos e contém cerca de 80 flores pequenas, de cor vermelho-rosada, sendo cerca de  $\frac{3}{4}$  delas, masculinas e  $\frac{1}{4}$ , hermafroditas. As flores hermafroditas dão origem, em média, a 5 ou 6 frutos por inflorescência, os quais podem cair antes de atingirem 5 mm de comprimento (Almeida *et al.*, 1998).

O fruto está dividido em duas partes distintas: fruto propriamente dito, que é uma núcula reniforme, com pericarpo duro e seco (castanha-de-cajú) e uma parte carnosu-sucosa, conhecida como caju que representa o pedicelo do fruto, espessado e modificado (Barroso *et al.*, 1999). O pseudofruto, a partir do pedúnculo, é bem desenvolvido com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro no ápice, de cor vermelha, claviforme, com polpa alva e succulenta (Almeida *et al.*, 1998). O fruto verdadeiro é um aquênio seco, acinzentado brilhante, em forma de rim, com 1,5 a 2 x 1 cm de comprimento, contendo uma amêndoa com dois cotilédones justapostos, ricos em gordura, com embrião pequeno e encurvado para a base. As estruturas mais conspícuas na parede desse fruto são as cavidades secretoras que ocupam a maior parte do mesocarpo. O óleo encontrado na castanha é corrosivo e volátil (Barroso *et*

*al.*, 1999). O pericarpo da castanha é mais ou menos desenvolvido, em função da espessura do mesocarpo, que é constituído por um tecido alveolar que aloja o “bálsamo do cajú” (Cashew Nut Shell Liquid - CNSL) que representa, em média, 20% da castanha inteira e 15% a 34% da castanha fresca, com 90% de ácido anacárdico e 10% de cardol em sua composição (Ferrão, 1995).

É desconhecida, nessa espécie, a quantidade de reserva orgânica contida nos cotilédones e a maneira como a energia é utilizada para o crescimento inicial dos órgãos subterrâneos e aéreos das plântulas (López-Naranjo & Pernía, 1990).

A semente, sem dormência, apresenta até 100% de taxa de germinação, embora existam registros de 65% de germinação, em um período de 15 a 25 dias (Ferrão, 1999).

Segundo Mitchell & Mori (1987) e Lopez-Naranjo (1977) o florescimento do *Anacardium humile* ocorre, geralmente, de agosto a setembro e a frutificação, em novembro, coincidindo a reprodução com a estação seca. A produção de sementes por planta é pequena, devido ao baixo sucesso dos frutos por panícula; mesmo que se leve em consideração a relação flores viáveis e número de frutos, a porcentagem de frutos formados é muito pequena (Ferrão, 1995).

Por ser uma espécie rasteira, o cajuzinho-do-cerrado concorre, com outras espécies, ao título de espécie em extinção sendo, no momento, considerada rara e protegida por lei (CEMIG, 2001). O porte baixo da planta torna-a, quando comparada ao cajueiro comum, mais susceptível às ações antrópicas e ao fogo. Na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, a espécie é de baixa ocorrência.

O cajuzinho-do-cerrado tem grande importância alimentar, industrial, medicinal e econômica e a castanha tem as mesmas características e usos do cajueiro comum (*Anacardium occidentale*), com ampla utilização para o consumo. A casca da castanha, por ser dura e rica em óleo viscoso, cáustico e inflamável, se transformou em um produto estratégico para a indústria e para a medicina. Da amêndoa, rica em proteína, calorias, lipídios, carboidratos, fósforo e ferro, é extraído um óleo comestível, que pode ser utilizado em substituição ao azeite de oliva (Almeida *et al.*, 1998).

Assim como a grande maioria das espécies do cerrado, o *Anacardium humile* St. Hill., tem importância biológica e socioeconômica. Os interesses antagônicos, aumentam a necessidade de gerar informações biológicas, na tentativa de adequar a exploração econômica, de modo que não haja utilização predatória ou, até mesmo, a extinção da espécie.

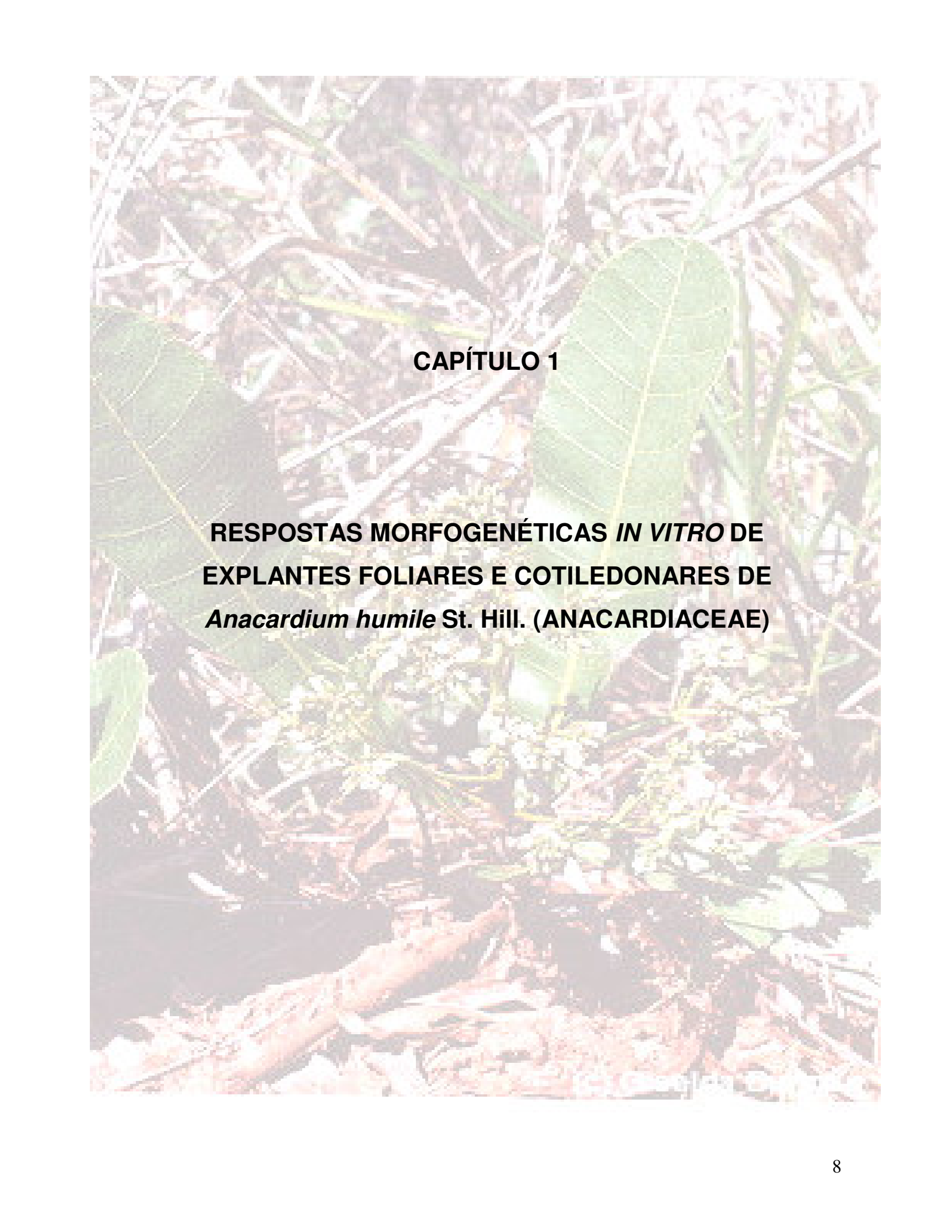
## OBJETIVOS GERAIS

Otimizar um protocolo de micropropagação para *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE), analisando as respostas morfogênicas obtidas de explantes foliares e cotilédones.

Identificar fungos existentes no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. e analisar os efeitos da adição de um fungicida sistêmico no meio de cultura para controle da contaminação, *in vitro*.

Analisar a divergência genética entre populações de *Anacardium humile* St. Hill. do Cerrado do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia – MG e de populações do Cerrado do Parque Estadual da Serra de Caldas – Caldas Novas, Goiás.

Comparar molecularmente, por AFLP, as populações que diferem morfológicamente, com a finalidade de analisar se as características resultam de processo de especiação.



## CAPÍTULO 1

### **RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES E COTILEDONARES DE *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE)**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CULTURA DE TECIDOS

O termo clonagem, já incorporado ao cotidiano das pessoas, deriva etimologicamente do grego klón, “broto” e pressupõe “qualquer grupo de células ou organismos produzidos assexuadamente de um único ancestral sexuadamente produzido”. O termo clone foi definido por Herbert J. Welber, em 1903, como uma população de moléculas, células ou organismos que se originam de uma única célula e que são idênticas à célula original e entre si (Pierce, 2003).

Com a possibilidade da clonagem de plantas a partir de células somáticas, o sonho do botânico austro-húngaro, se tornou realidade. Gottlieb Haberlandt publicou, em 1902, a sua idéia sobre o princípio da “Teoria da Totipotência” onde, profeticamente, postulou que os seres vivos têm capacidade de regenerar seus corpos inteiros a partir de células únicas. Nem ele, nem os seus discípulos da época calcularam que suas tentativas abririam novos horizontes para a humanidade o que, atualmente, é aplicado em Biotecnologia Vegetal. A técnica da clonagem *in vitro* de plantas é possível mediante a cultura de tecidos (Entendendo..., 2001?).

A cultura de tecido vegetal pressupõe técnicas que visam obter plantas a partir de explantes, os quais podem ser meristemas, partes da folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos. Essa técnica baseia-se na totipotência celular, isto é, na capacidade de uma célula qualquer da planta regenerar uma nova planta, visto que possui toda a informação genética para tal (Mantell *et al.*, 1994.) permitindo a reprodução de plantas em condições totalmente assépticas a partir de um número pequeno de segmentos de tecido, regenerando uma grande quantidade de plantas geneticamente iguais à planta matriz, em meio de cultura adequado (Hernández & Rubio, 2002).

A micropropagação é um sistema importante para os programas de melhoramento, pois possibilita a produção, em massa, de clones considerados superiores (Braga *et al.*, 1997). Constitui-se num método alternativo às técnicas tradicionais de propagação vegetativa (Pierik, 1990) e, em âmbito comercial, a

importância deve-se ao fato de manter o material livre de doenças e de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (Torres *et al.*, 1998).

Para o sucesso na propagação *in vitro*, é necessário controlar variáveis como a composição do meio de cultura, a origem dos explantes utilizados e as condições físicas ambientais (Grattapaglia & Machado, 1990).

Dentre os diversos meios de cultivo utilizados na micropropagação, o mais difundido é o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), que contém concentrações relativamente altas de macronutrientes.

O meio de cultura para a maioria dos tecidos vegetais requer quatro grupos de compostos: a) uma fonte de carbono na forma de açúcar (sacarose); b) nutrientes inorgânicos, compreendendo macro e micronutrientes; c) vitaminas, essencialmente tiamina e d) reguladores de crescimento, principalmente auxinas e citocininas. Podem ser adicionadas, ainda, misturas como extratos de leveduras e malte, suco de tomate, água de coco, caseína hidrolisada e substâncias antioxidantes (Matos Brito, 1980).

Os reguladores de crescimento ou fitohormônios são substâncias que regulam, *in vitro*, o comportamento da planta (Ribeiro, 1999). São substâncias orgânicas que apresentam ação sobre o crescimento e alguns tipos de organogênese. Os principais grupos são as auxinas e citocininas. Dentre as auxinas, destacam-se o ácido indol - 3 - butírico (AIB) e o ácido 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). As citocininas mais usadas são a 6 - benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (KIN). O thidiazuron (TDZ) é um regulador de crescimento derivado de uréia (Andrade, 1998).

As auxinas são aplicadas na fase de estabelecimento da cultura para suprir os teores endógenos dos explantes. A adição de auxina na fase de multiplicação não é essencial, mas pode ser favorável ao crescimento da parte aérea e pode anular o efeito inibitório das citocininas sobre o alongamento (Grattapaglia & Machado, 1990). A ação das citocininas consiste em quebrar a dominância apical e promover a proliferação de gemas axilares, durante a fase de multiplicação (Tisserat, 1987; Grattapaglia & Machado, 1990).

Desde o início do século, a propagação de plantas *in vitro* tem atraído pesquisadores que utilizam as técnicas de cultura de tecidos vegetais como ferramentas importantes para solucionar problemas fitossanitários, que ocorrem com a propagação e o melhoramento genético de plantas (Paranhos *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 1998).

O cultivo *in vitro* de espécies da família Anacardiaceae é ainda restrito possivelmente pelo elevado índice de contaminação e oxidação, embora alguns bons resultados possam ser encontrados em trabalhos apresentados na literatura.

## 2. RESUMO

O *Anacardium humile* St. Hill., conhecido como cajuzinho-do-cerrado ou cajuí, é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae que ocorre naturalmente em Campo Sujo e no Cerrado do Brasil. Tem importância alimentar, industrial, medicinal e econômica e a castanha tem as mesmas características e usos do cajuí comum, com ampla utilização para o consumo. Pelo fato das espécies do Cerrado mostrarem interesses antagônicos, biológico e socioeconômico, torna-se necessário gerar informações biológicas, na tentativa de uma adequada exploração econômica, para evitar a utilização predatória ou, até mesmo, a extinção da espécie. Otimizou-se um protocolo de micropropagação para o cajuí, verificando as respostas morfogênicas obtidas a partir de explantes foliares. Explantes distintos foram utilizados para os testes de desinfestação e estabelecimento *in vitro*, sendo que os frutos foram os mais responsivos na diferenciação tissular. Frutos cedidos pelo CENARGEN (Bahia) germinaram por 17 dias em câmara fria e as folhas das plântulas foram selecionadas e desinfestadas com álcool 50% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos e três lavagens consecutivas em água autoclavada. Os explantes foram colocados em meio MS variando-se as concentrações de 2,4-D e BAP. A formação de calos foi verificada em ausência de auxina e presença de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de citocinina e na combinação de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, que produziram, em média, 0,22 calos por plântula. A oxidação foi fator limitante para o estabelecimento *in vitro* dessa espécie podendo ser observada em todos os tratamentos realizados. A concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP em ausência de 2,4-D foi a que proporcionou o menor índice de oxidação (0,6). O tratamento mais responsivo para o número de brotações ocorreu adicionando-se 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP isento de auxina, que produziu 01 (um) broto por explante. O comprimento das brotações foi influenciado pelas doses de citocinina, sendo que o maior comprimento (0,5 cm) foi verificado em meio suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D em combinação com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

### 3. ABSTRACT

*Anacardium humile* St. Hill., known as “cajuzinho-do-cerrado” or cajuí, is a species belonging to the Anacardiaceae family which normally grows in Campo sujo and in the Brazilian Cerrado. It has industrial, alimentary, medicinal and economic importance and the nut has the same characteristics and uses of the ordinary type of cashew tree, with a wide use for consumption. It's necessary to generate biologic information once the cerrado species hold antagthony interests, looking for an adequate economic exploration, in order to avoid the predatory use, or even the species extinction. One register of micro propagation for the cajuí was optimized, certifying the morphogenetic responses obtained from the foliar explants. Distinct explants were used for the tests of disinfestation and *in vitro* establishment once the fruit were the ones that responded the best in the tissue differentiation. Fruit provided by CENARGEN (Bahia) germinated for 17 days in a cold chamber and the plantulas leaves were selected and disinfested using a mixture containing 50% of alcohol for 1 minute, 1% of sodium hipocloridate for 10 minutes and a consecutive triple washing in autoclaved water. The explants were put in MS environment varying the concentrations of 2,4-D and BAP. The formation of callus was verified in the absence of auxin and presence of 5,0 mg L<sup>-1</sup> of citocinine and in the combination of 0,1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D and 10,0 mg L<sup>-1</sup> of BAP, which on average produced, 0,22 callus for each plantet. The oxidation was a limiting factor for the *in vitro* establishment of this species being observed in all the treatments done. It's also interesting to mention that the concentration of 5,0 mgL<sup>-1</sup> of BAP in the absence of 2,4-D was the one that produced the least oxidation (0,6). The best treatment considering response for the number of shoots occurred adding 5,0 mg L<sup>-1</sup> of BAP without auxin, producing 1 shoot for explant. The extension of the shooting was influenced by the doses of citocin. The biggest length (0,5 cm) was verified in an environment supplemented with 0,1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D in combination with 1,0 mg L<sup>-1</sup> of BAP.

#### **4. OBJETIVO**

Otimizar um protocolo de micropropagação *in vitro* para *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) analisando as respostas morfogénéticas obtidas a partir de explantes foliares e cotilédones.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

O material biológico, *Anacardium humile* St.Hill., também conhecido como cajuí, cajuzinho-do-cerrado e do campo, foi obtido de mudas provenientes de sementes germinadas e desenvolvidas em Casa de Vegetação da Universidade Federal de Uberlândia, de plantas do Clube Caça e Pesca Itororó no município de Uberlândia – MG, do Parque Estadual da Serra de Caldas no município de Caldas Novas – Goiás e de frutos coletados em Luis Eduardo Magalhães (BA) cedidos pela EMBRAPA –CENARGEN (Bahia).

### **5.1. ÁREAS DE COLETA**

#### **5.1.1. CLUBE CAÇA E PESCA ITORORÓ DE UBERLÂNDIA – MG**

O material de estudo (folha) foi coletado em áreas preservadas da Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó, localizada em Uberlândia, MG (18°55'23"S e 48°17'19" W). A reserva está situada a oeste do município, distando 10 km do centro da cidade. Nessa reserva o tipo fisionômico dominante é o Cerrado (sentido restrito) (Fuzeto *et al.*, 2001).

O clima da região apresenta duas estações bem definidas: seca e úmida, podendo apresentar tanto temperaturas acima de 35°C como geadas esporádicas, no inverno. A precipitação anual e as médias diárias de temperatura oscilam em torno de 1550 mm e 22°C, respectivamente (Rosa *et al.*, 1991).

As coletas foram realizadas nas primeiras quinzenas dos meses de março e novembro de 2004.

### **5.1.2. PARQUE ESTADUAL DA SERRA DE CALDAS NOVAS - GO**

Folhas das plantas foram coletadas no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas (PESCAN), localizado entre os municípios de Caldas Novas e Rio Quente, no sudeste do Estado de Goiás, a 180 km da capital, Goiânia - GO (Andrade & Sarmiento, s.d.). As coletas ocorreram no dia 28 de novembro de 2004.

### **5.1.3. LUIZ EDUARDO MAGALHÃES (BA)**

Os frutos foram coletados no município de Luiz Eduardo de Magalhães (BA) e armazenados no CENARGEN – EMBRAPA (BA). O município possui área de 3.944km<sup>2</sup>, localizando-se a oeste da Bahia.

Estudos climáticos demonstram haver um gradiente térmico de -0,5 °C, em geral, na temperatura média compensada anual (Tma) a cada 100 m de altitude, sendo maior a variação no inverno. A variação da temperatura na área é influenciada, também, pela grande distância em relação ao oceano - efeito de continentalidade - que funciona como regulador térmico. Essa distância determina a maior amplitude térmica média anual do Estado da Bahia (11,5 °C). Em função das características climáticas, a sua classificação varia de úmido a subúmido, ambos megatérmicos, na Região Econômica 15, a seco subúmido megatérmico, na Região Econômica 14, com características de transição para o semi-árido, ao norte ([http://www.totaltrade.com.br/PAGES/OESTE\\_BAHIA\\_3.htm](http://www.totaltrade.com.br/PAGES/OESTE_BAHIA_3.htm)).

## 5.2 CULTURA DE TECIDOS

Os experimentos do cultivo *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Na definição metodológica, otimizou-se protocolos de desinfestação de explantes para crescimento *in vitro*, para padronizar um método que permitisse o cultivo da espécie em larga escala.

### 5.2.1. DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DE *Anacardium Humile* St. Hill.

#### 5.2.1.1. TESTE I: MATRIZES DE CASA DE VEGETAÇÃO E VARIAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE MEIO DE CULTURA E ANTIOXIDANTE

Mudas produzidas a partir de sementes de cajuí germinadas, mantidas em casa de vegetação, foram utilizadas como matrizes doadoras de explantes. As mudas foram tratadas com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de fungicida sistêmico benomyl (metil –1 butilcarbomoil – 2 – benzimidazol – carbamato) 15 dias antes da inoculação.

Folhas jovens (Figura 1) foram excisadas, lavadas em água corrente com detergente Tween 20, submersas em álcool 50% por 3 minutos, imersas em hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos, sob constante agitação e lavadas em água destilada autoclavada por três vezes consecutivas, em câmara de fluxo laminar (VECO).

Os explantes (Figura 2) foram submetidos a quatro tratamentos de inoculação, variando-se a concentração do meio Murashige & Skoog (1962) conforme Tabela 1 (MS 50% e MS 100%) em presença e ausência de carvão ativado (antioxidante).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (tratamento x antioxidante) constituído por 4 repetições em parcelas constituídas de três tubos, com um explante por tubo.



Figura 1: Matrizes de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) (seta) utilizadas na seleção de explantes para o cultivo *in vitro*. UFU - Uberlândia, MG – 2005.



Figura 2: Explante foliar (seta) de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) inoculado em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2005.

Tabela 1. Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog 100% (1962) para a cultura de tecidos de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE).

| <b>CONSTITUINTES</b>                 | <b>mg L<sup>-1</sup></b> | <b>CONSTITUINTES</b> | <b>mg L<sup>-1</sup></b> |
|--------------------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| <b>INORGÂNICOS</b>                   |                          | <b>ORGÂNICOS</b>     |                          |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 1650                     | Glicina              | 2                        |
| KNO <sub>3</sub>                     | 1900                     | Tiamina HCl          | 0,1                      |
| CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O | 440                      | Sacarose             | 3000                     |
| MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O | 370                      | Ágar                 | 0,7%                     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 170                      | Inositol             | 100                      |
| KI                                   | 0,83                     | Ácido<br>nicotínico  | 0,5                      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | 6,2                      | Piridoxina HCl       | 0,5                      |
| MnSO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O | 22,3                     |                      |                          |
| ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O | 4,086                    |                      |                          |
| NaMoO <sub>4</sub> 2                 | 25                       |                      |                          |
| H <sub>2</sub> O                     |                          |                      |                          |
| CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O | 2,5                      |                      |                          |
| CoCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O | 2,5                      |                      |                          |
| FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O | 27,8                     |                      |                          |
| Na <sub>2</sub> EDTA 2               | 37,408                   |                      |                          |
| H <sub>2</sub> O                     |                          |                      |                          |

#### **5.2.1.2. TESTE II: MATRIZES DE CASA DE VEGETAÇÃO COM VARIAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E ÁLCOOL (PRESENÇA E AUSÊNCIA)**

As mudas provenientes da casa de vegetação foram utilizadas como fonte de explante para o segundo teste de desinfestação foliar. As mudas foram levadas ao Laboratório, lavadas em água corrente e os explantes foram submetidos ao processo de desinfestação.

Após os tratamentos, tanto os segmentos foliares quanto os segmentos radiculares foram lavados por três vezes consecutivas em água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar (VECO). Todos os explantes foram submersos em ácido ascórbico a  $600 \text{ mg L}^{-1}$  e inoculados em meio MS 50%.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 4 \times 2$  em presença e ausência de álcool 70% por 30 segundos, concentração de hipoclorito de sódio (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%), tempo de exposição (15 e 20 minutos), constituído por 4 repetições, em parcelas constituídas de dois tubos, com um explante por tubo.

#### **5.2.1.3. TESTE III: MATRIZES DO CLUBE CAÇA E PESCA ITORORÓ DE UBERLÂNDIA – MG.**

Folhas e xilopódio foram excisadas de plantas nativas do Cerrado do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia-MG e levados ao Laboratório, onde foram lavados em água corrente durante 12 horas para redução dos níveis de compostos fenólicos.

Posteriormente, as matrizes doadoras de explantes foram lavadas com Tween 20 e os explantes submetidos aos tratamentos de desinfestação. Foram realizados dois testes: um com explantes foliares e outro, com explantes caulinares (xilopódio).

Os explantes foliares foram desinfestados em álcool 70% por 30 segundos seguido de lavagem em hipoclorito de sódio, em concentrações de 1,0%, 1,5% e 2,0%. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado constituído de 4 repetições, com 3 tubos por parcela e um explante por tubo.

O teste de desinfestação dos xilopódios foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 : hipoclorito de sódio (1,0% e 2,0%) X tempo de exposição ao agente (10 e 15 minutos). Todos explantes foram imersos, inicialmente, em álcool 70% por 30 segundos.

Os explantes desses testes foram lavados por três vezes consecutivas em água destilada autoclavada e imersos em ácido ascórbico a 600 mg L<sup>-1</sup> e inoculados em meio MS 50%, em câmara de fluxo laminar (VECO).

#### **5.2.1.4. TESTE IV: MATRIZES DO CLUBE CAÇA E PESCA ITORORÓ DE UBERLÂNDIA – MG INOCULADAS EM MEIO MS 50% E MS 100% ACRESCIDOS DE REGULADORES DE CRESCIMENTO**

Folhas jovens obtidas de plantas do Clube foram coletadas para a condução do experimento em Laboratório. As folhas foram lavadas em água corrente e detergente Tween 20 e submetidas ao processo de desinfestação, que consistiu de lavagem em álcool etílico (96°G) à 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio à 1,0% por 10 minutos. Posteriormente, os explantes foram lavados por três vezes consecutivas em água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar (VECO) e inoculados nos meios de cultura, com diferentes tratamentos.

Os tratamentos consistiam da variação nas concentrações do meio de cultura MS 50% e MS 100% e de reguladores de crescimento 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4 - D) uma auxina, nas concentrações 0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mgL<sup>-1</sup> e 6 - benzilaminopurina (BAP) uma citocinina, nas concentrações 0,0; 1,0; 5,0 e 10,0 mgL<sup>-1</sup>, para ambos os meios.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 4 x 4 (meios, 2,4-D, BAP), com delineamento inteiramente casualizado constituído por 3 repetições, em parcelas constituídas de dois tubos, com um explante por tubo.

#### 5.2.1.5. TESTE V: SEMENTES PROVENIENTES DA SERRA DE CALDAS – GOIÁS PARA A CULTURA DE TECIDOS DE COTILÉDONES E EIXO EMBRIONÁRIO DE CAJUZINHO-DO-CERRADO

As sementes (Figura 3) com aproximadamente 2 cm, foram coletadas em propriedade particular localizado no município de Goiânia – Goiás e submetidas ao processo de desinfestação.



Figura 3: Semente de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) coletada no Parque Estadual da Serra de Caldas, Caldas Nova – Goiás, 2005.

A primeira etapa da desinfestação foi a imersão das sementes em água destilada acrescida de Tween 20 por 5 minutos sob constante agitação. Posteriormente, foram colocadas em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos.

Em câmara de fluxo laminar (VECO), as sementes foram lavadas por três vezes consecutivas em água destilada autoclavada.

Os cotilédones (Figura 4) foram removidos com auxílio de bisturi e pinça, previamente autoclavados e divididos em três segmentos: proximal, mediano e

distal, esse último o eixo embrionário. Os segmentos proximal e mediano foram novamente divididos e colocados em meio de cultivo, de maneira adaxial e abaxial (Figura 5).



Figura 4: Cotilédones (setas) de sementes de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

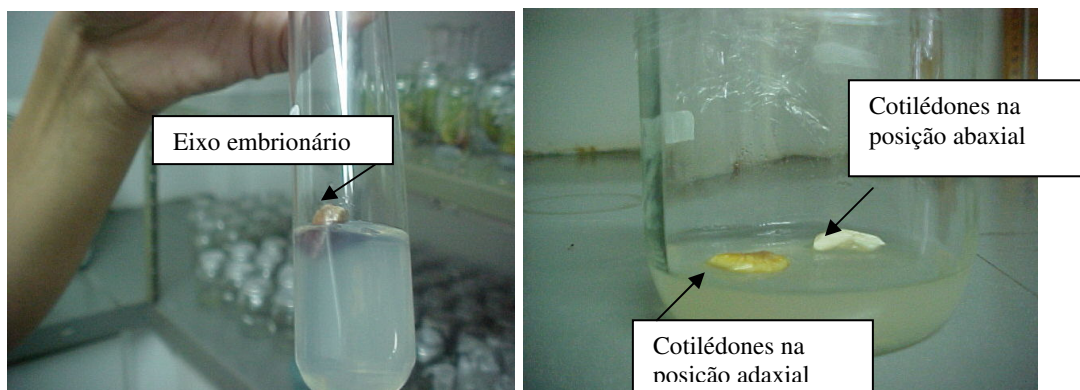


Figura 5: Inoculação de eixo embrionário e cotilédones de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) nas posições abaxial e adaxial. UFU - Uberlândia, MG – 2005.

Os tratamentos realizados variaram em concentração do meio de cultura MS 50% e MS 100% e de reguladores de crescimento 2,4 - D e BAP, nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,0; 1,0; 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, para ambos os meios. Em todos os tratamentos foi utilizado ácido ascórbico a 600 mg L<sup>-1</sup>. Os explantes foram mantido no escuro por 7 dias. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 x 4 x 4 (meios, 2,4-D, BAP), com delineamento inteiramente casualizado constituído por 3 repetições, em parcelas constituídas de dois tubos, com um explante por tubo.

### **5.3. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO *IN VITRO***

Os segmentos foliares e/ou caulinares de, aproximadamente, 0,5 cm<sup>2</sup> foram retirados com tesoura autoclavada e os cotilédones e eixo embrionário, com auxílio de pinça e bisturi. O material foi inoculado em tubos de ensaio ou vidro de 200 mL.

A vidraria e os meios foram previamente esterilizados em autoclave vertical (FANEM) à temperatura de 121°C, sob a pressão de 1 atm por 20 minutos e a transferência dos explantes foi feita em câmara de fluxo laminar (VECO). O pH do meio foi ajustado para  $5,8 \pm 1$  e foram distribuídos 10 mL de solução em cada tubo de ensaio e 25 mL, nos vidros.

Após a inoculação dos segmentos foliares, caulinares, cotiledonares e/ou eixo embrionário, foi realizada a transferência para câmara de crescimento com temperatura de 25°C  $\pm 1$  e fotoperíodo de 16 horas.