

5.4. FRUTOS DE *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE)

Os frutos foram cedidos pela EMBRAPA – CENARGEN (BA).

5.4.1. GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DOS FRUTOS

Os frutos (sementes) com, aproximadamente 1,5 cm foram selecionados, submetidos ao processo de embebição em água corrente por 24 horas e colocados para germinar em bandejas contendo vermiculita, com 50 sementes por bandeja, as quais foram colocadas em câmara fria com temperatura de 26°C.

Após 17 dias, folhas das plântulas provenientes de sementes recém germinadas (Figura 6), foram excisadas e levadas à sala de desinfestação de materiais do Laboratório de Cultura de Tecidos. A desinfestação consistiu da imersão das folhas em álcool 50% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos.

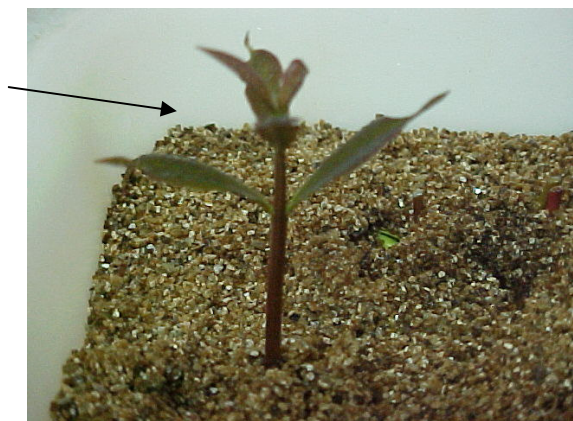


Figura 6: Plântulas germinadas a partir de sementes de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

Em câmara de fluxo laminar (VECO), as folhas (explantos) provenientes das sementes germinadas passaram por três lavagens consecutivas em água destilada autoclavada e foram colocados em meio MS 100% variando-se as concentrações de 2,4-D (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 5,0; 10,0 mg L⁻¹), acrescido de 600 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4 (2,4-D, BAP) com 7 repetições em parcelas constituídas de três tubos, com um explante por tubo.

As análises foram realizadas aos 30 e 45 dias após a inoculação dos explantes.

5.4.2. INOCULAÇÃO DE COTILÉDONES DE *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE)

Para a inoculação dos cotilédones de cajuí, os frutos foram selecionados e submetidos ao processo de desinfestação, que consistiu de imersão em álcool 96% por 5 minutos e hipoclorito de sódio 2% acrescido de 1,0 g L⁻¹ de Benomyl por 72 horas, sob constante agitação.

Em câmara de fluxo laminar (VECO), as sementes foram lavadas por 3 vezes consecutivas em água destilada autoclavada e, com auxílio de bisturi e pinça, os cotilédones foram retirados e seccionados.

Os cotilédones foram submetidos a um segundo processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 0,5% por 3 minutos e, antes da inoculação, foram mergulhados em água destilada autoclavada.

Os explantes foram colocados na posição adaxial e abaxial, em meio MS 100% com variação das concentrações de 2,4-D (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 5,0; 10,0 mg L⁻¹) acrescido de 600 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e mantido no escuro por 7 dias.

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4 (2,4-D, BAP) em parcelas constituídas de três tubos,

com um explante por tubo. As análises foram realizadas aos 45 dias após a inoculação dos cotilédones.

5.4.3. REPICAGEM DAS BROTAÇÕES, CALOS FRIÁVEIS E COTILÉDONE OBTIDOS NA CULTURA DE TECIDOS de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE)

Aos 45 dias da inoculação, o cotilédone, as brotações e calosidades formadas foram transplantados para meio MS 100% por 7 dias, após o que os explantes foram inoculados, aleatoriamente, em meio MS 50% e MS 100% suplementados de 0,5 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético); 0,5 mgL⁻¹ de KIN (cinetina) em combinação com BAP nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mgL⁻¹ e os meios foram acrescidos de 600 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2 (BAP, meio) com 18 repetições e um explante por tubo. Para os cotilédones utilizou-se somente 2 repetições.

6. CARACTERÍSTICAS AVALIADAS

As avaliações foram realizadas aos 30 e 45 dias após o estabelecimento *in vitro* dos explantes, sendo que as análises foram cumulativas. Para a repicagem do material inoculado, a avaliação foi feita aos 30 dias do estabelecimento *in vitro*.

O número de brotações formado de explantes foliares e raízes provenientes de explantes cotiledonares foi determinado por contagem considerando-se como brotações, raízes adventícia e principal de 0,05 cm.

O comprimento das brotações foi avaliado em centímetros com o auxílio de régua, considerando-se a altura em relação à inserção da ramificação foliar da brotação à ramificação central da plântula (Figura 7).



Figura 7: Brotos de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) (seta) formados em meio MS suplementado de 5,0 mg L⁻¹ de BAP aos 30 dias de estabelecimento *in vitro*. UFU - Uberlândia, MG – 2005.

A presença de calos e contaminação foi analisada atribuindo-se 1 (um) para presença de calos e explantes contaminados e 0 (zero) para ausência de calos e contaminação.

7. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO *IN VITRO*

Os tubos 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. Após a inoculação os explantes foram colocados em câmara de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 16 horas.

8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas SANEST, com aplicação do teste de F a 1% e 5% de probabilidade, sendo transformados em $\sqrt{x+1/2}$, onde X = média das variáveis analisadas. As concentrações dos reguladores de crescimento foram analisadas por regressão polinomial.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1.CULTURA DE TECIDOS

9.1.1. DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DE *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE)

Aos 15 dias da inoculação dos explantes, foi realizada a avaliação dos Testes I, II, IV e V, conforme Material e Métodos, constatando-se 100% de contaminação fúngica para os tratamentos utilizados, independente das variações de hipoclorito de sódio, tempo de exposição ao agente desinfestante e combinação de reguladores de crescimento.

A avaliação do Teste III foi feita 30 dias após a inoculação dos explantes em meio de cultura.

Além do elevado índice de contaminação, todos os explantes sofreram oxidação como mostram as Figuras 8 e 9.

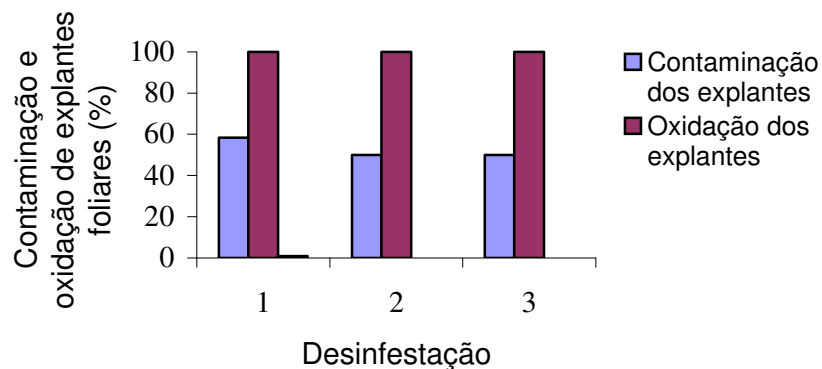


Figura 8: Contaminação e oxidação de segmentos foliares no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

- 1 - Álcool 70% 30' e hipoclorito de sódio 1,0% 15'
- 2- Álcool 70% 30' e hipoclorito de sódio 1,5% 15'
- 3- Álcool 70% 30' e hipoclorito de sódio 2,0% 15'

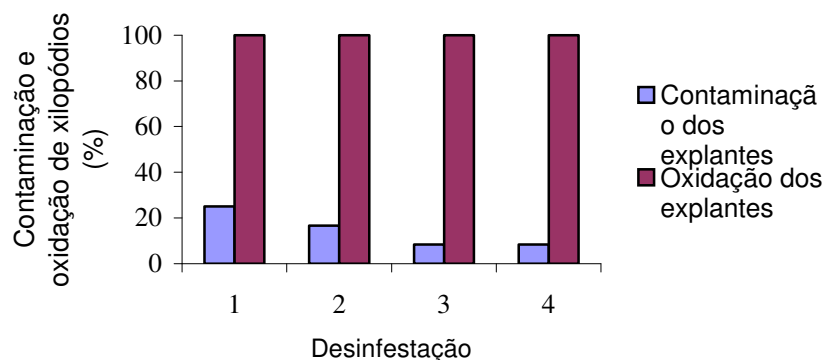


Figura 9: Contaminação e oxidação de explantes caulinares no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEA). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

- 1 - Álcool 70% 30' e hipoclorito de sódio 1,0% 10'
- 2- Álcool 70% 30' e hipoclorito de sódio 1,0% 15'
- 3- Álcool 70% 30' e hipoclorito de sódio 2,0% 10'
- 4- Álcool 70% 30' e hipoclorito de sódio 2,0% 15'

Utilizando-se xilopódio como explante de micropropagação, o índice de contaminação foi menor quando comparado com os explantes foliares, no entanto, oxidação elevada foi observada em todos os explantes inoculados.

Uma das explicações para a menor taxa de contaminação dos explantes caulinares, pode ter sido a retirada do floema desses explantes, uma vez que o caule subterrâneo da planta apresenta maiores chances de contaminação.

Para espécies, onde os níveis de contaminação são altos, as alternativas mais comuns para conter a proliferação de microrganismos são a de aumentar a concentração do agente desinfestante e/ou tempo de exposição ao mesmo, embora ambas as alternativas possam comprometer a integridade do tecido vegetal (Krishnan *et al.*, 1995). Este fato pode ser constatado quando elevou-se os percentuais e/ou de hipoclorito de sódio e período de exposição ao agente desinfestante, em todos os tratamentos realizados em *Anacardium humile*. Tanto o aumento da concentração quanto o acréscimo ao tempo de exposição aos agentes desinfestantes não foram eficientes no controle da contaminação *in vitro*, em nossos experimentos.

Como os explantes utilizados eram provenientes do campo, aumentou-se consideravelmente a chance de contaminação. Teixeira (2001) cita que a contaminação endógena é mais freqüente em plantas mantidas em campo e essa contaminação se torna de difícil controle, em laboratório. Segundo o mesmo autor, as plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis, os quais exercem importante papel no metabolismo dessas espécies, bem como na defesa contra predadores e microrganismos. Além disso, existem substâncias presentes no meio de cultura, comumente encontradas em algumas espécies lenhosas, identificadas como sendo fenóis, flavonóides e taninos, responsáveis pela oxidação (Preece & Compton, 1991).

A liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas (Lerch, 1981). As quinonas são responsáveis pela coloração marrom das culturas, e causam a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies (Monaco *et al.*, 1977).

Para Pious & Ravindra (1997), o maior problema na iniciação de culturas lenhosas é a ocorrência de compostos fenólicos que estão ligados a processos de regulação de crescimento, especialmente com as auxinas, que dependendo da sua concentração endógena no tecido, resulta na indução desses compostos.

A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo. Alguns gêneros de plantas são mais suscetíveis à oxidação fenólica do que outros e depende igualmente do tipo de explante utilizado. Explantes jovens, em geral, oxidam menos que os velhos (Teixeira, 2001).

Tipos adequados de explantes retirados em épocas apropriadas podem apresentar um menor teor endógeno de fenóis nos tecidos e, com isto, minimizar a oxidação. Da mesma forma, menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação podem contribuir para minimizar o problema (Teixeira, 2001).

Para minimizar os efeitos das substâncias fenólicas, deve-se adicionar ao meio de cultura substâncias antioxidantes, tais como: carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico e ácido cítrico (Andrade, 1998), entretanto o ácido ascórbico deve ser esterilizado por filtração, já que é uma substância termolábil (Teixeira, 2001). Tais substâncias agem pela remoção do oxigênio de outras moléculas e atuam, também, por mecanismos alternativos; os ácidos cítrico e ascórbico reagem com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem (George, 1996). O ácido ascórbico parece ser o mais efetivo na prevenção da oxidação polifenólica, dentre os diversos antioxidantes (Gupta, 1986).

A oxidação fenólica tem sido controlada em diferentes espécies lenhosas pela redução da intensidade luminosa (Marks & Simpson, 1990), associada com a substituição freqüente do meio de cultura, o que aumenta a chance de se obter sucesso no estabelecimento e cultivo de explantes de espécies lenhosas (Teixeira, 2001).

Agentes antioxidantes foram utilizados no processo de inoculação dos explantes de cajuí, mas, tanto o carvão ativado quanto o ácido ascórbico foram ineficazes no controle da liberação de substâncias fenólicas, e os explantes mostraram elevado índice de oxidação.

9.2. INDUÇÃO DE RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) PROCEDENTES DE LUIS EDUARDO MAGALHÃES. FRUTOS CEDIDOS PELA EMBRAPA – CENARGEN (BA).

9.2.1. INDUÇÃO DE RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE EXPLANTES FOLIARES

Aos 30 e 45 dias do estabelecimento *in vitro* dos explantes foram analisados a oxidação, contaminação, formação de calos, número e comprimento de brotações.

Os resumos das análises de variância para as características citadas, em ambas avaliações, estão apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: 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.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS					
		OXIDAÇÃO		CONTAMINAÇÃO		CALOSIDADE	
		30	45	30	45	30	45
2,4-D	3	0,0199 ^{ns}	0,1114 ^{ns}	0,5537 [*]	0,6065 [*]	0,0112 [*]	0,0537 ^{**}
BAP	3	0,0088 ^{ns}	0,0544 ^{ns}	0,0976 ^{ns}	0,1138 ^{ns}	0,0043 ^{ns}	0,0030 ^{ns}
2,4-D x BAP	9	0,0232 ^{ns}	0,0905 ^{ns}	0,0323 ^{ns}	0,0239 ^{ns}	0,0056 ^{ns}	0,0107 ^{ns}
Resíduo	96	0,0264	0,1078	0,1869	0,1810	0,0039	0,0077

ns: não significativo pelo teste *F* ($P < 0,05$);

*: significativo pelo teste *F* ($P < 0,05$);

** : significativo pelo teste *F* ($P < 0,01$);

FV: fonte de variação;

GL : graus de Liberdade.

Tabela 3: 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.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS			
		BROTAÇÕES		COMPRIMENTO	
		30	45	30	45
2,4-D	3	0,0042 ^{ns}	0,2090 ^{ns}	0,0072 ^{ns}	0,0138 ^{ns}
BAP	3	0,0216 ^{ns}	0,4667 [*]	0,1576 [*]	0,1834 [*]
2,4-D x BAP	9	0,0045 ^{ns}	0,8970 ^{ns}	0,0256 ^{ns}	0,0457 ^{ns}
Resíduo	96	0,0097	17,1434	0,0573	0,0611

ns: não significativo pelo teste *F* ($P < 0,05$);

*: significativo pelo teste *F* ($P < 0,05$);

** : significativo pelo teste *F* ($P < 0,01$);

FV: fonte de variação;

GL : graus de Liberdade.

9.2.1.1. FORMAÇÃO DE CALOS

A análise de variância dos dados obtidos para formação de calos registrou que a indução de calos foi significativamente influenciada pelas doses de 2,4-D, tanto aos 30 como aos 45 dias de inoculação (Tabela 2), fls 35.

Aos 30 dias de estabelecimento *in vitro*, observou-se que à medida que se elevam as doses de 2,4-D há um acréscimo, em média, de 0,057 calos formados nos explantes foliares de cajuí, enquanto que aos 45 dias verifica-se que esse aumento foi de 0,129 (Figura 10). Esses dados mostram que o tempo de permanência no meio de indução está relacionado à calogênese de explantes foliares de cajuí, quanto mais tempo no meio indutor, maior a calogênese.

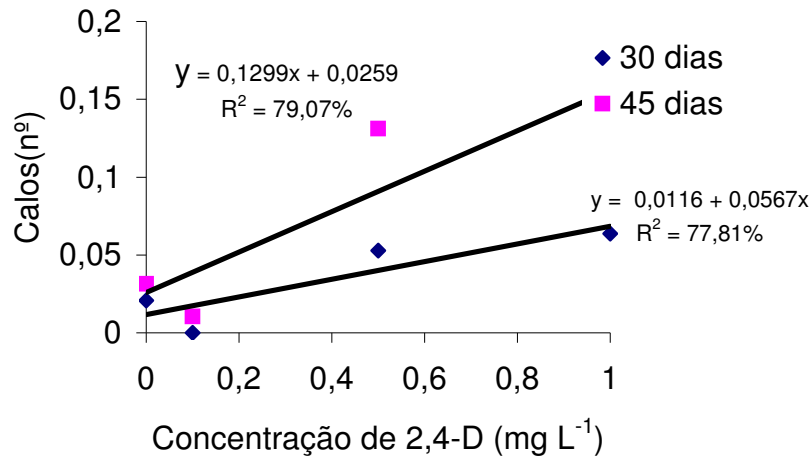


Figura 10: Regressão para o número médio de calos formados no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) em meio MS sob a ação de diferentes concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

Em ausência de 2,4-D e concentração de 5,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 30 dias da inoculação, houve melhor indução de calos, com média de 0,13 calos por parcela. No entanto, não se observou formação de calosidades nos tratamentos com 0,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg L⁻¹ de BAP; 0,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP; 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg L⁻¹ de BAP; 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP; 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D em combinação com 0,0mgL⁻¹; 1,0 mgL⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ de BAP; 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D em combinação com 1,0 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 4).

Esses resultados foram similares aos obtidos por Rocha (1998) que observou em *Anacardium occidentale* (cajú) aumento na indução de calos à medida que se aumentava a dose de 2,4-D, obtendo em média, 1,43 calos na dose 0,1 mg L⁻¹ até 1,78 calos com 5 mg L⁻¹, ocorrendo em seguida, decréscimo para 1,6 calos na concentração de 1 mg L⁻¹, concentração na qual, para o cajuí, não obteve-se indução de calo.

Segundo Válio (1986), quando se aplica auxina em um órgão isolado, ocorre aumento de resposta paralela ao aumento da concentração, até certo limite, após o qual começa a ocorrer efeito inibitório.

Tabela 4: Média do número de 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.

2,4-D(mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0	0	0,1312	0,0858
0,1	0	0	0,0857	0,0857
0,5	0	0	0	0,0420
1,0	0,0857	0	0	0,0420
CV (%)	8,612			

Aos 45 dias de estabelecimento *in vitro*, a melhor concentração para o crescimento de calos foi a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D de 10 mg L⁻¹ de BAP em ausência de auxina com 5,0 mg L⁻¹ de BAP produzindo, em média, 0,22 calos por parcela. O controle e as combinações: 0,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP; 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg L⁻¹ de BAP; 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP; 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP não induziram a formação de calos nessa espécie (Tabela 5).

Tabela 5: Média do número de 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). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

2,4-D(mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0	0	0,2272	0,1312
0,1	0	0	0,1312	0,2180
0,5	0	0,0420	0,0858	0,0858
1,0	0,1312	0	0,0858	0,1226
CV(%)	11,584			

Resultados semelhantes foram obtidos por Maciel (2001) e Palú (2002) para *Coffea arabica* que concluíram que, para a indução de calogênese é necessária a combinação de auxina com citocinina. Dentre as auxinas sintéticas, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético é, segundo Gamborg *et al.* (1976), o mais adequado à indução e manutenção do calo.

Experimentos de Velho *et al.* (1988) e Ferreira *et al.* (2001) mostraram que cupuaçu não apresenta dificuldades para gerar calos utilizando-se o meio MS com a adição de baixas concentrações de 2,4-D, sendo a eficiência na emissão de calos aumentada pela adição de ANA.

Esse experimento mostra que, para a indução de calos, o mais adequado é utilizar 5,0 mg L⁻¹ de BAP sem a adição de 2,4-D ao meio de cultura.

9.2.1.2. CONTAMINAÇÃO DOS EXPLANTES

A contaminação foi estatisticamente influenciada pelas doses de 2,4-D tanto aos 30 quanto aos 45 dias de inoculação como mostra a análise de variância da Tabela 2, fls 35.

Independentemente do número de dias para o estabelecimento *in vitro*, quanto maior a dose da auxina (2,4-D) menor foi o número de explantes contaminados. Aos 30 dias, à medida que as concentrações aumentaram, ocorreu um decréscimo, em média, de 0,56 explantes contaminados, *in vitro*, enquanto que aos 45 dias ocorre diminuição, em média, de 0,60 explante contaminado (Figura 11).

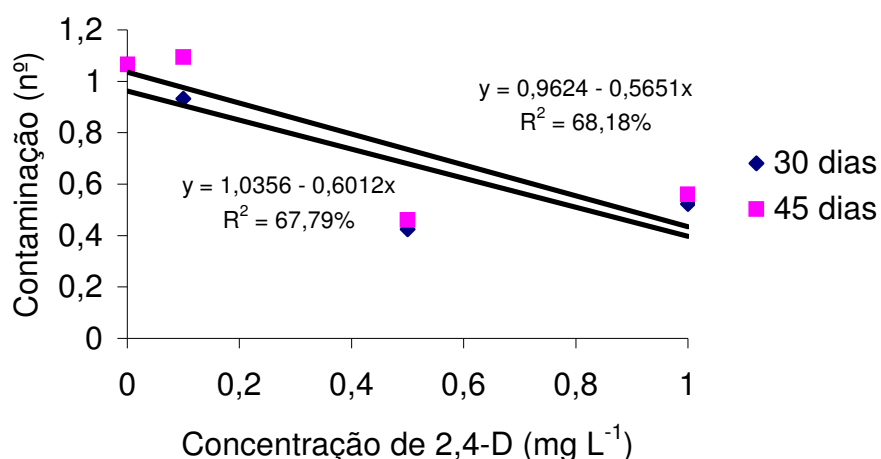


Figura 11: Regressão para o número médio de explantes contaminados, aos 30 e 45 dias do cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) em meio MS sob ação de diferentes concentrações de 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

Medeiros (1999,) trabalhando com segmentos nodais de *Spondias mombim* em meio WPM suplementado de ANA e BAP e utilizando como agente desinfestante o bicloreto de mercúrio (0,02%) em presença e ausência de hipoclorito de sódio (1,0%) observou grande quantidade de explantes contaminados, sendo que os menores percentuais de contaminação foram 68% e 62%, respectivamente. Valores

semelhantes de contaminação foram relatados por Krishnan *et al.* (1995) ao trabalharem com explantes de *Trichopus zeylanicus* provenientes do campo.

Segundo Romano & Martins-Loução (1992) apud Romano *et al.* (1995), a aplicação de bicloreto de mercúrio, seguida de hipoclorito de sódio, é bastante efetiva na desinfestação de explantes de *Quercus suber*. No entanto, Medeiros (1999) afirma que a base de bicloreto de mercúrio aumenta a porcentagem de mortalidade dos explantes, fato já esperado devido à alta toxicidade desse desinfestante em relação ao hipoclorito de sódio (Grattapaglia & Machado, 1998).

No presente estudo, o índice de contaminação foi elevado em todos os tratamentos realizados, porém as maiores taxas foram observadas, aos 30 dias de estabelecimento *in vitro* (Tabela 6), na concentração de 1,0 mg L⁻¹ da auxina em ausência e em combinação de 1,0 mg L⁻¹ de citocinina, apresentando média de um explante contaminado por tubo de ensaio. O menor índice de contaminação foi verificado na combinação de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D com 5,0 mg L⁻¹ de BAP, com média de 0,2 explantes contaminados por tubo de ensaio.

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.

2,4-D(mgL ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0,9329	0,5625	0,4601	0,6105
0,1	1,1623	1,0336	0,5625	0,5625
0,5	0,9328	0,9328	0,2310	0,3629
1,0	1,2474	1,2474	0,4601	0,5625
CV (%)	39,126			

Aos 45 dias de inoculação dos explantes (Tabela 7), o número médio de explantes contaminados foi de 1,25 por tubo de ensaio, índice encontrado na presença de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e ausência de BAP e na combinação de 1,0 de 2,4-

D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP. A dose de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D em combinação com 5,0 mg L⁻¹ de BAP foi a mais eficiente, considerando-se a contaminação, apresentando média de 0,23 patógenos por parcela.

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.

2,4-D(mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0,9328	0,8136	0,4601	0,6105
0,1	1,1623	1,2222	0,7204	0,7204
0,5	0,9328	1,1115	0,2310	0,3629
1,0	1,2474	1,2474	0,4601	0,5625
CV (%)	37,629			

A combinação de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 5 mg L⁻¹ de BAP foi a melhor em prevenir contaminação *in vitro*, para o cajuí.

9.2.1.3. OXIDAÇÃO DOS EXPLANTES

Os resultados obtidos para a oxidação dos explantes não foram estatisticamente significativos pelo teste de *F* a 5% de probabilidade, tanto aos 30 quanto aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* dos explantes foliares (Tabela 2, fls 35).

Aos 30 dias (Tabela 8), verificou-se que a oxidação foi maior quando se adicionou 5,0 mg L⁻¹ de BAP em meio isento de 2,4-D. Observou-se que, em média, 0,6 explantes por tubo de ensaio se oxidaram nessa dosagem de regulador de crescimento. Entretanto, para as concentrações de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0mgL⁻¹ de BAP, a oxidação foi menor atingindo, em média, 0,17 explantes foliares.

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.

2,4-D(mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0,3536	0,3006	0,6039	0,3828
0,1	0,5066	0,3104	0,3637	0,3006
0,5	0,4541	0,4647	0,2817	0,3930
1,0	0,3637	0,1784	0,4083	0,3930
CV (%)	17,363			

Aos 45 dias (Tabela 9), a média de explantes oxidados aumentou, sendo que a concentração que proporcionou maior oxidação foi a de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D sem citocinina no meio de cultura, observando-se média de 1,54 explantes oxidados por parcela. Em contrapartida, a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D proporcionou a menor taxa de oxidação de explantes, sendo observados 0,61 explantes oxidados por parcela.

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.

2,4-D(mgL ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	1,3088	1,0118	1,4483	1,3974
0,1	1,1273	0,9441	1,1744	0,8893
0,5	1,5132	1,5403	0,9885	0,7718
1,0	1,5403	0,6105	1,1154	1,1396
CV (%)	25,594			

Wang & Huang (1976) citam que o cultivo *in vitro* por um período longo induz a formação de compostos fenólicos no meio, que podem causar necrose e posterior morte dos explantes e Utino *et al.* (2001) recomendam que, para a permanência do explante por mais tempo em um mesmo meio, faz-se necessário a adição de ácido ascórbico para reduzir a oxidação. Entretanto para Teixeira (2001), o ácido ascórbico é uma substância termolábil e por esse motivo, tal antioxidante não foi utilizado no meio de cultura de seu trabalho.

Melo *et al.* (2001), trabalhando com embriões de guarrobeira, verificaram que o ácido ascórbico promoveu um acréscimo na percentagem de embriões viáveis (93,30% de germinação).

A família Anacardiaceae, em geral, possui nas paredes da núcula, espaços resinosos que são cavidades secretoras e ocupam a maior parte do mesocarpo (Barroso, 1999) e o óleo encontrado na castanha, provavelmente, está relacionado aos elevados índices de oxidação encontrados nos explantes estabelecidos *in vitro*.

O PVP (polivinilpirrolidona) possui, também, ação antioxidante e vem sendo utilizado para prevenir a oxidação de compostos fenólicos. Entretanto essa substância não foi testada nesses experimentos, pois considerou-se ser o ácido ascórbico mais eficiente como antioxidante, por ser biológico e estar presente em

altas concentrações em muitos compartimentos celulares, como o estroma dos cloroplastos (Larson, 1988). Andrade (1998) mostra que o problema de oxidação foi o fator limitante para o desenvolvimento das anteras de café mesmo utilizando PVP. Melo *et al.* (2001) verificaram a importância dos antioxidantes no controle da oxidação no embrião da guarirubeira, com resultados melhores para o ácido ascórbico (3,37%) em relação ao PVP (22,25%).

Pasqual *et al.* (2002) trabalhando com anteras de *Coffea arabica* L. inoculadas em meio MS acrescido de PVP, observaram que sua adição ao meio de cultura aumentou significativamente a indução de calos, atingindo um máximo de 67% na dosagem de 200 mg L⁻¹. O emprego de PVP nessa dosagem, também, proporcionou a menor oxidação às anteras, sendo que dosagens superiores passaram a apresentar efeito deletério.

Gratapaglia & Machado (1998) recomendam lavar os explantes, principalmente de espécies lenhosas, para prevenir os problemas de oxidação. Em algumas espécies não há influência do tempo de lavagem quanto à oxidação (Deschamps & Pinto, 1993). Sato *et al.* (2001) estudando *Celtis* sp. concluíram que a oxidação independe do tempo de lavagem quando a espécie libera fenóis que provocam oxidação e morte dos explantes. Esses autores verificaram ainda, que a lavagem em água favoreceu a distribuição de fungos, que estariam impregnados em locais onde o hipoclorito não atingiu.

Nesse trabalho foi adicionada a concentração de 600 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, o que não foi suficiente para prevenir a oxidação, indicando que a oxidação deve estar mais relacionada à presença do óleo nos explantes do que à interferência do cultivo *in vitro*.

9.2.1.4. NÚMERO DE BROTAÇÕES

Os resultados para essa característica, não foram significativos pelo teste de F a 5% de probabilidade na primeira avaliação, no entanto, aos 45 dias de estabelecimento *in vitro*, os níveis de BAP influenciaram significativamente no número de brotos formados (Tabela 3, fls 36).

Observa-se, pela Tabela 10 que a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10 mg L⁻¹ de BAP e todas as combinações realizadas com 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D não foram eficazes para promover brotações de cajuí aos 30 dias de estabelecimento *in vitro*. Embora o número de brotos por explantes tenha sido pequeno, a ausência de 2,4-D e 5,0 mg L⁻¹ de BAP foi o tratamento que proporcionou o maior número de brotos, atingindo média de 0,16 brotos por explante.

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.

2,4-D(mgL ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0,0421	0,0775	0,1606	0,1226
0,1	0,0421	0,0421	0,1227	0
0,5	0	0	0	0
1,0	0,0858	0,0421	0,0421	0,0775
CV (%)	13,245			

Aos 45 dias (Tabela 11), a ausência de 2,4-D e 5,0 mg L⁻¹ de BAP foi o melhor na promoção de número de brotos, produzindo 01 (um) broto por explante, enquanto que a dose de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D não influenciou essa característica, exceto na combinação 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 5,0 mg L⁻¹ de BAP. Observa-se, que o tempo de exposição dos explantes no meio de indução favoreceu a formação de brotos nessa espécie, indicando que seu desenvolvimento seja lento.

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.

2,4-D(mgL ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0,1922	0,2627	1,0416	0,7613
0,1	0,4155	0,4964	0,8559	0,1922
0,5	0	0	0,1922	0
1,0	0,6701	0,4964	0,4964	0,1922
CV (%)	45,424			

A análise de regressão (Figura 12) mostra que o aumento dos níveis de BAP provoca diminuição do número médio de brotos até 5,37 mg L⁻¹ do regulador, com a formação de 0,07 brotos por explante. A partir dessa concentração o número de brotos tende a aumentar.

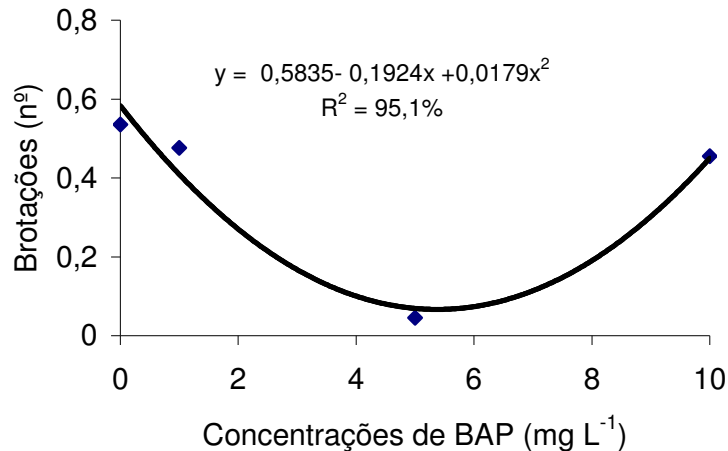


Figura 12: Regressão para o número de brotações de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE) formados em meio MS variando-se as concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) aos 45 dias de estabelecimento *in vitro*. UFU – Uberlândia, MG. 2005.

Citocininas são, normalmente, utilizadas para induzir a formação de um grande número de brotos, estimulando a produção de parte aérea e taxas de multiplicação. Já auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações, incrementam o crescimento, estando relacionadas com a regulação da organogênese, em conjunto com as citocininas (Hu & Wang, 1983; George & Sherrington, 1984)

Monteiro *et al.* (2000) regeneraram, *in vitro*, plantas de *Passiflora suberosa* por meio de discos foliares. A organogênese foi obtida utilizando-se meio MS acrescido de 0,5 mg L⁻¹ ou 1,0 mg L⁻¹ de BAP, sendo que os explantes responderam bem aos tratamentos formando, inicialmente, calos e, posteriormente, gemas, desenvolvendo-se e enraizando em meio de cultura contendo 1,0 mg L⁻¹ de GA₃.

D'Silva & D'Souza (1992) utilizando como explantes apenas os nós cotiledonares do cajueiro mostraram que a dosagem de BAP que induziu maior número de brotações foi a de 4,8 mg L⁻¹.

O aumento da concentração de BAP para 0,1; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ resultou na redução do comprimento médio dos brotos axilares de 6,9 para 6,8 e 4,8 mm, respectivamente, em caju anão precoce (Medeiros, 1999).

Alencar & Melo (1995) trabalhando com segmentos nodais de *Spondias tuberosa* (umbú) verificaram que a formação de brotos foi reduzida com o aumento da concentração de BAP e indicaram a concentração de 1,0 mg L⁻¹ como a mais favorável ao desenvolvimento dos brotos axilares.

O efeito inibitório do BAP quando aplicado em altas concentrações (5 ou 10 mgL⁻¹) também foi relatado por Krishnan *et al.* (1995) no cultivo de *Trichopus zeylanicus*.

Silva Neto *et al.* (1992) observaram que o BAP em concentrações acima de 2 mg L⁻¹ no meio de cultura, para micropropagação de cajú, causou aumento da oxidação na multiplicação das gemas, com a testemunha apresentando melhor taxa de multiplicação.

Lucchesini e Vitagliano (1993) mostram que além das citocininas, o aumento nas concentrações de cálcio no meio de cultura promove aumento no número e tamanho das brotações em *Prunus cerasifera*.

De acordo com os resultados, o maior número de brotos foi obtido em ausência de 2,4-D e 5,0 mg L⁻¹ de BAP produzindo, 01 (um) brotos aos 45 dias de estabelecimento *in vitro*.

9.2.1.5. COMPRIMENTO DAS BROTAÇÕES

O comprimento das brotações foi influenciado pelos níveis de BAP aos 30 e aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* conforme visto na Tabela 3 (fls 36) que mostra o Quadro de Análise de Variância para essa característica.

O comprimento das brotações, além das doses de BAP suplementadas ao meio MS, foram influenciadas pelo tempo de exposição dos explantes *in vitro*. Aos 30 dias da inoculação o número de brotações decresceu até 5,18 mg L⁻¹ de citocinina, não ocorrendo alterações no comprimento dos explantes foliares inoculados. No entanto, na segunda avaliação, o comprimento das brotações aumentou até a

concentração de 5,04 mg L⁻¹ de BAP, atingindo comprimento médio de 0,18 cm por broto formado (Figura 13).

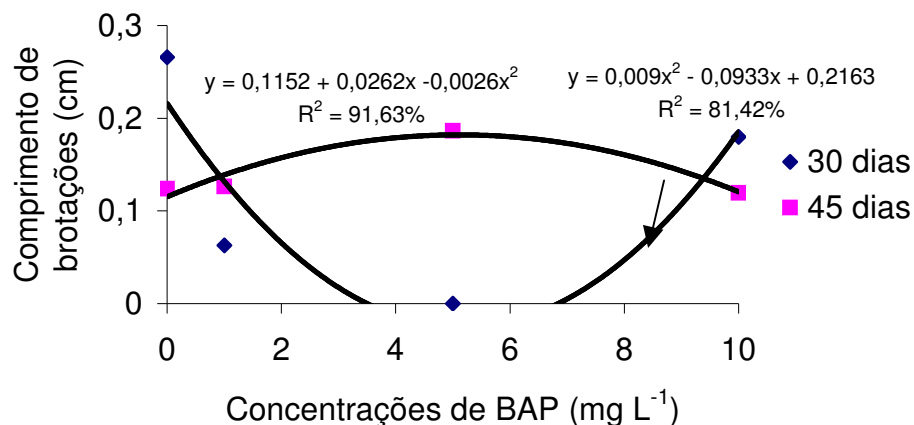


Figura 13: Regressão para o comprimento das brotações (cm) de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE) em meio MS variando-se as concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) aos 30 e 45 dias de estabelecimento *in vitro*. UFU – Uberlândia, MG. 2005.

Os resultados aqui obtidos não foram observados por Abreu *et al.* (2003) que, trabalhando com *Cissus sicyoides*, verificaram que a presença de BAP no meio de cultura não influenciou, de modo significativo os resultados.

Roustan, Latche & Fallot (1992) e Ficadenti & Rotino (1995) mostram que ANA e BAP são os mais efetivos reguladores de crescimento envolvidos na regeneração, estimulando a formação de gemas e brotações.

Aos 30 dias (Tabela 12) verificou-se que a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP foi a mais eficiente em promover o crescimento das brotações, observando-se um comprimento, em média, de 0,50 cm. Entretanto as concentrações de 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, em todas as combinações com BAP, não promoveram crescimento dos brotos.

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.

2,4-D(mgL ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0,1922	0,1769	0,3797	0,3242
0,1	0,0265	0,4998	0,1837	0
0,5	0	0	0	0
1,0	0,3704	0,1530	0,0609	0,1531
CV (%)	30,338			

Na segunda avaliação (Tabela 13), com 1,0 mg L⁻¹ de auxina isento de citocinina promoveu aumento de 0,56 cm no comprimento das brotações.

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.

2,4-D(mgL ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0,1922	0,1769	0,3798	0,3582
0,1	0,0406	0,0499	0,1837	0
0,5	0	0	0,11	0
1,0	0,5691	0,3004	0,0902	0,1531
CV (%)	30,584			

Silva *et al.* (2002) avaliaram o efeito do BAP e do benomyl na propagação *in vitro* de abacaxi (*Ananas comosus* L.). Utilizaram o meio MS suplementado com BAP nas concentrações 0, 1, 2, 3 mg L⁻¹ e benomyl nas concentrações 0, 50, 100, 200 e 400 mg L⁻¹. O número de brotos maiores que 1 cm aumentou até a concentração de

1,58 mg L⁻¹ de BAP em combinação com 100 mg L⁻¹ de benomyl (4,28 brotos). Na ausência do benomyl foram obtidos 4,56 brotos maiores do que 1 cm, na concentração máxima de BAP.

Kiss *et al.* (1995) induziram a proliferação de 2,6 brotos de abacaxizeiro *in vitro*, após decapitação e estiolamento de plântulas em meio MS contendo 1mgL⁻¹ de ANA. Quando os brotos estiolados foram cultivados em meio com 20 de BAP ou 25 mg L⁻¹ de cinetina, houve produção de 13 e 15 plântulas/gemas, respectivamente.

Segundo Dublin (1980), as citocininas são indispensáveis não só para a indução, mas também, para o desenvolvimento de gemas neoformadas.

Os brotos maiores de cajuí (0,57 cm) foram obtidos nas concentrações de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D sem adição da citocinina.

9.3. INDUÇÃO DE MORFOGÊNESE DE EXPLANTES COTILEDONARES

Aos 45 dias do estabelecimento *in vitro* dos cotilédones (Figura 14) foram analisados o número e comprimento de raízes, além do seu intumescimento.

Os resultados obtidos não foram significativos, pelo teste de *F* a 5% de probabilidade, para todas características analisadas. O resumo das análises de variância está apresentado na Tabela 14.



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.

Tabela 14: 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). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS		
		Número de raízes	Comprimento das raízes	Intumescimento dos cotilédones
2,4-D	3	0,0559 ^{ns}	0,1016 ^{ns}	0,0055 ^{ns}
BAP	3	0,0559 ^{ns}	0,1016 ^{ns}	0,0055 ^{ns}
2,4-D x BAP	9	0,0559 ^{ns}	0,1016 ^{ns}	0,0055 ^{ns}
Resíduo	32	0,0559	0,1016	0,0055

ns: não significativo pelo teste *F* ($P < 0,05$);

FV: fonte de variação;

GL : graus de Liberdade.

Para todas as características analisadas, o único tratamento responsivo para indução de a rizogênese e intumescimento do cotilédone foi a ausência de 2,4-D e 10,0 mg L⁻¹ de BAP. O número de cotilédones intumescidos foi, em média, de 0,27 por vidro inoculado nesse tratamento (Tabela 15). O intumescimento do cotilédone pode estar relacionado com a manutenção inicial dos cotilédones no escuro. Além do intumescimento, observou-se que o cotilédone aumentou em tamanho. No estabelecimento *in vitro* inicial, o cotilédone tinha em média, 1,5 cm e ao final dos 45 dias, o cotilédone apresentava tamanho de 5,0 cm.

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.

2,4-D(mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0	0	0	0,2738
0,1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
1,0	0	0	0	0
CV (%)	10,402			

Rocha (1998) verificou, também, aumento no tamanho do cotilédone de cajueiro, associado aos crescentes níveis de 2,4-D, sendo a concentração de 0,5 mg L⁻¹ a que apresentou melhor resultado, com tamanho médio de 2,0 cm.

Hegde *et al.* (1994) verificaram que o crescimento do cotilédone ultrapassou duas a três vezes seu tamanho original após duas semanas de cultivo.

O número de raízes formadas aos 45 dias (Tabela 16) foi, em média, de 01 (uma) por cotilédone inoculado, com aproximadamente 1,58 cm de comprimento em presença de 10,0 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 17).

Tabela 16: Média do número de raízes formadas aos 45 dias de estabelecimento *in vitro* de *Anacardium humile* 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.

2,4-D(mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0	0	0	1,0703
0,1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
1,0	0	0	0	0
CV (%)	31,898			

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.

2,4-D(mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0,0	0	0	0	1,5829
0,1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
1,0	0	0	0	0
CV (%)	42,324			

A posição do cotilédone interferiu no processo de rizogênese, sendo que a posição adaxial foi a mais adequada para a indução de raízes adventícias e principal, resultado que se contrapõe aos de Rocha (1998) que, trabalhando com a cultura de cajú, observou que o número de raízes adventícias formadas não sofreu influência da posição do cotilédone em relação ao eixo embrionário e em relação ao meio de cultura.

Os resultados obtidos nesse experimento contradizem os de literatura que utilizam o cotilédone como fonte de explante. As respostas morfogénéticas obtidas para nesse experimento foram baixas quando comparadas com dados da literatura.

Rocha (1998) verificou que em cajú, houve aumento na indução de raízes à medida que se aumentou as doses de 2,4-D, sendo a dose 0,5 mg L⁻¹ a mais responsiva.

Sondahl *et al.* (1985) verificaram que, em segmentos foliares de café, a indução de raízes adventíceas acompanhou os níveis crescentes de 2,4-D, sendo observada a formação de raízes, nesses tecidos, com a dose mínima de 1µM. Esses autores sugerem que a rizogênese seja induzida com pouco tratamento hormonal, podendo com a exposição prolongada dessa auxina ocorrer efeito inibitório.

Wang *et al.* (2003) verificaram que, segmentos do cotilédone e segmentos foliares foram responsivos para a indução de calos e brotações de *Spartina alterniflora*. O meio MS contendo 3 mg L⁻¹ de BAP ou TDZ foi eficiente na regeneração de brotações, sendo que 100% dos calos formados produziram brotos. A regeneração de brotos aumentou com o aumento das concentrações de BAP e TDZ no meio. Embora o TDZ induza à brotação, ele inibe a regeneração radicular em *Spartina alterniflora* (Shan *et al.*, 2000).

Venturieri & Venturieri (2004) utilizaram segmentos de eixo embrionário e de cotilédones em meio MS 50% mais 2,4-D (1,2,4 e 8 mg L⁻¹) para a indução de calos na cultura do híbrido de *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum*. Quanto à frequência de explantes responsivos, os tecidos mostraram diferentes capacidades de desenvolver calos, mas não se mostraram influenciados pela dosagem de TDZ. Os explantes de cotilédones induziram formação de calos, em maior frequência. Independente do tecido e do tipo de calo, a dosagem de 5 µg L⁻¹ de TDZ foi a que provocou melhor resposta para esse experimento.

Diferentes respostas com níveis de 2,4-D, utilizando explantes cotiledonares ocorreram nos trabalhos de Scutti & Zanete (1997); Alessandra *et al.* (1997); Gill *et al.* (1994) e Gupta *et al.* (1984), que verificaram a indução de calos embriogênicos e não embriogênicos em guariroba, *Carica papaya*, *Cytrus* “Kinnow” e coco,

respectivamente, mostrando que, com exceção de guariroba e *Carica papaya*, as demais espécies necessitam, além da auxina 2,4-D, a presença de uma citocinina no meio indutor.

Dode *et al.* (2004) cultivaram *in vitro*, cotilédones de sementes germinadas do manjerição *Ocimum basilicum*. A maior eficiência na formação de brotos foi obtida utilizando 5,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de ANA, sendo que a presença de ANA inibiu a formação de raízes quando combinada com diferentes concentrações de citocinina. Altas concentrações de BAP induziram aumento no número de explantes com brotos e no número de brotos/cotilédone.

Silva Neto *et al.* (1992) trabalhando com cajú anão precoce utilizaram, para o enraizamento, o regulador IBA nas concentrações de 0,1 mg L⁻¹ ; 0,2 mg L⁻¹ e 0,4 mg L⁻¹, sendo que a melhor dosagem de IBA foi a de 0,4 mg L⁻¹, durante 7 dias de inoculação.

Thomé *et al.* (2004) estudaram os processos fisiológicos envolvidos no estabelecimento de protocolos eficientes de micropropagação de calanchoe, testando diferentes genótipos, tipos de explantes e condições de cultura para a micropropagação e enraizamento de gemas aéreas adventícias. Utilizando segmentos de pecíolo como explante, não foi observada morfogênese em nenhum dos tratamentos, indicando que a utilização deste tipo de explante é inviável para os cultivares e condições de cultura testados.

Trabalhando com cultivo *in vitro* de *Pistacia vera* L. (pistache) Onay *et al.* (2003) utilizaram cotilédones maduros, que cresceram em meio MS acrescidos dos sais do meio Gamborg (1995). Quatro semanas após a inoculação, os brotos apicais foram micropropagados adicionando 1,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio. A auxina apresentou efeito positivo sobre a rizogênese, de forma que a maior média de obtenção de raízes (2,06) foi observada com explantes cultivados em meio WPM suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ANA, enquanto que em ausência de ANA não foi observada a formação de raízes. A citocinina interferiu negativamente na rizogênese, com o aumento da concentração de BAP acompanhado da redução da média de obtenção de raízes.

A formação de raízes adventícias na base de explantes nodais de *S. mobim* foi favorecida, preferencialmente, pelo cultivo destes em meio WPM suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ANA, em ausência de BAP ou em presença de concentrações baixas do regulador (0,05 mg L⁻¹).

Rocha (1998); Grattapaglia & Machado (1998) confirmam esse efeito inibitório da citocinina e o efeito indutor da auxina sobre a formação de raízes.

Segundo Peres (2002) quando um explante não desenvolve organogênese *in vitro*, a falha, normalmente, se dá na etapa de aquisição de competência, porém, pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos envolvidos na aquisição de competência para organogênese (Kerbaui, 1999).

Amirato (1985) sugere que a competência para rizogênese ou embriogênese é dependente da região do explante, do tipo de hormônio utilizado e da duração do tempo de exposição desse hormônio. Nesse sentido, George (1996) salienta que fatores relacionados à condição fisiológica do explante, características da espécie e condições experimentais, como a composição do meio de cultura e atmosfera dos frascos, podem não favorecer o estabelecimento da competência e recepção dos sinais para desencadear o processo de diferenciação celular.

O potencial de regeneração na cultura é diretamente influenciado por mudanças sequenciais nas variáveis intrínsecas e extrínsecas, sendo o regulador de crescimento apenas um dos fatores externos, que afeta o desenvolvimento da cultura. As células que compõem o tecido do explante apresentam diferentes tempos nas respostas aos tratamentos indutivos e à manipulação do meio, como por exemplo, a remoção total ou parcial de citocinina e/ou auxina poderá promover as mais variadas respostas morfogênicas nas espécies (Amirato, 1985).

Para a indução de morfogênese em cotilédones de *A. humile* a concentração de 10,0 mg L⁻¹ de BAP isento da auxina foi a única responsiva.

9.4. SUBCULTIVO DAS BROTAÇÕES, CALOS E COTILÉDONE OBTIDOS NA CULTURA DE TECIDOS DE *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE)

O subcultivo foi realizado após os explantes serem submetidos às mesmas condições de cultivo, ou seja, serem transplantados ao meio MS por um período de 10 dias.

Decorrido esse período, as análises foram realizadas aos 30 dias de estabelecimento *in vitro*, analisando-se a oxidação, calosidade, contaminação, número e comprimento das brotações.

O resumo do quadro de análise de variância se encontra na Tabela 18.

Tabela 18: 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.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		Oxidação	Contaminação	Calosidade	Brotações	Comprimento
BAP	2	0,0521 ^{ns}	0,0397 ^{ns}	0,0174 ^{ns}	0,0729 ^{ns}	0,0077 ^{ns}
Meio	1	0,0025 ^{ns}	0,0397 ^{ns}	0,0223 ^{ns}	0,0368 ^{ns}	0,0136 ^{ns}
BAP X Meio	2	0,0918 ^{ns}	0,0099 ^{ns}	0,0224 ^{ns}	0,0305 ^{ns}	0,0065 ^{ns}
Resíduo	102	0,0626	0,0578	0,0495	0,0422	0,0072

ns: não significativo pelo teste F ($P < 0,05$);

FV: fonte de variação;

GL : graus de Liberdade.

Para todas as variáveis, o teste de F a 5% de probabilidade foi não significativo, portanto, foram analisadas as médias das análises de regressão para as variáveis meios de cultura e doses de BAP.

As doses de ANA e KIN não influenciaram na análise estatística por terem sido suplementadas aos meios em idênticas concentrações.

9.4.1. FORMAÇÃO DE CALOS

Com relação à indução de calos (Tabela 19), observou-se que tanto o meio MS 50% suplementado de 1,5 de BAP quanto o meio MS 100% acrescido de 0,5 ou de 1,5 de BAP produziram uma média de 0,22 calo por explante. A concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP em meio MS 50% foi a pior para a formação de calos; 0,08 por explante.

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.

Meio	BAP (mg L ⁻¹)		
	0,5	1,0	1,5
50%	0,0846	0,1759	0,2240
100%	0,2240	0,1759	0,2240
CV (%)	26,898		

Thomé *et al.* (2004) observaram a formação de calos e raízes nos segmentos de limbo de calanchoe e a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP foi melhor na indução de calogênese comparado com a concentração de 0,5 mg L⁻¹. A indução de enraizamento somente foi verificada no meio controle, demonstrando que este tipo de morfogênese é, aparentemente, favorecido pela ausência total de reguladores de crescimento no meio de cultura. A adição de citocinina ao meio de cultura favoreceu a indução morfogênica dos explantes, sendo que a concentração de 1,0 mg L⁻¹ foi a que levou aos melhores níveis de resposta.

Oliveira *et al.* (1989) induziram a formação de calos e raízes a partir de explantes foliares de *Spondias tuberosa* (umbú) cultivados em meio suplementado com 4,6 µM de cinetina. Alencar & Melo (1995), trabalhando com segmentos nodais dessa espécie verificaram que a formação de brotos foi reduzida com o aumento da

concentração de BAP e indicaram a concentração de 1,0 mg L⁻¹ como a mais favorável ao desenvolvimento dos brotos axilares.

O meio MS 100% acrescido de 0,5 e 1,5 mg L⁻¹ de BAP e MS 50% suplementado de 1,5 mg L⁻¹ de BAP foram os melhores na indução de calogênese de cajuzinho-do-cerrado, 0,22 calos por explante.

9.4.2. CONTAMINAÇÃO

Em meio MS 100% acrescido de 1,0 e 1,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,32 explantes apresentaram contaminação. A adição de 0,5 mg L⁻¹ de citocinina, em ambos os meios (MS 50% e MS 100%), proporcionou o menor número médio de explantes contaminados, 0,17 (Tabela 20).

A contaminação foi, exclusivamente, por bactérias, diferente do experimento anterior que mostrou contaminação por fungos.

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.

Meio	BAP (mg L ⁻¹)		
	0,5	1,0	1,5
50%	0,1759	0,2240	0,2240
100%	0,1759	0,3252	0,3252
CV (%)	27,938		

A menor taxa de contaminação foi obtida, nesses experimentos, na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP em ambos os meios de cultivo.

9.4.3. OXIDAÇÃO

Apesar de ocorrer elevado índice de oxidação em todas combinações de meios e fitorreguladores, os explantes mantidos em meio MS 100% acrescido de 0,5 de BAP foram os que apresentaram maiores índices de tecido oxidado, 0,79 por tubo inoculado (Tabela 21).

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.

Meio	BAP (mg L ⁻¹)		
	0,5	1,0	1,5
50%	0,5474	0,6071	0,5474
100%	0,7962	0,4330	0,5474
CV (%)	24,110		

A oxidação não pode ser controlada eficientemente, a menor percentagem de oxidação foi obtida com 1,0 mg L⁻¹ de BAP em meio MS 100% (0,43) para o *A.humile*.

9.4.4. NÚMERO DE BROTAÇÕES

O número médio de brotações (Tabela 22) foi maior quando utilizado o meio MS 50% com a concentração de 1,0 de BAP, apresentando, em média, 0,22 brotos por tubo de ensaio. O meio MS 100% acrescido de 0,5 de citocinina e o meio MS 50% suplementado de 1,5 de BAP não induziram a formação de brotos adventícios.

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.

Meio	BAP (mg L ⁻¹)		
	0,5	1,0	1,5
50%	0,0846	0,2168	0
100%	0	0,0846	0,0415
CV (%)	27,227%		

Silva Neto *et al.* (1992) utilizaram sementes do clone “Anão Precoce” de cajú para a indução de brotos múltiplos, em meio básico suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ KIN. O BAP foi eficiente em promover brotações múltiplas na base dos cotilédones em sementes germinadas *in vitro*, sendo que o maior número de brotações foi observado no tratamento contendo 10 mg L⁻¹ de BAP.

Abreu *et al.* (2003) trabalhando com *Cissus sicyoides* verificaram que a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura influenciou de modo significativo os resultados. Os fitorreguladores promoveram altura de 3,34 cm, 1,3 gemas e 1,12 raízes a mais do que o controle. A cinetina proporcionou 0,3 cm de altura a menos que BAP e 0,6 gema e 0,85 raízes a mais do que o meio com BAP. NA presença de cinetina, o uso de ANA foi significativo em aumentar a altura e o número de raízes, entretanto, na presença de BAP não houve efeito significativo de ANA. O tratamento que proporcionou maior número de gemas (4,0), altura (6,5 cm) e

número de raízes (4,7) por tubo de ensaio foi o que continha 4,64 m M de cinetina acrescido de 2,7 mM de ANA.

Kiss *et al.* (1995) induziram a proliferação de 2,6 brotos de abacaxizeiro, *in vitro*, após decapitação e estiolamento de plântulas, em meio MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de ANA. Quando os brotos estiolados foram cultivados em meio com 20 de BAP ou 25 mg L⁻¹ de cinetina, houve produção de 13 e 15 plântulas/gema, respectivamente.

Medina *et al.* (2004) fizeram a propagação clonal de seis variedades de arroz, cultivados na Argentina. A concentração de 5,0 mg L⁻¹ de BAP foi responsável pela multiplicação de brotos, no entanto, o enraizamento foi observado no meio isento de fitorreguladores. Essas plantas regeneradas pelo cultivo *in vitro* foram aclimatadas com sucesso, mantendo a estabilidade genética da progênie.

Para brotação de cajuí, nas condições experimentais testadas, o melhor meio foi o MS 50% suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

9.4.5. COMPRIMENTO DAS BROTAÇÕES

O comprimento das brotações (Tabela 23), embora pequeno, foi maior em meio MS 50% com as concentrações 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, com 0,06 cm. A dose 0,5 mg L⁻¹ de BAP em meio MS 100% não promoveu brotação, assim como a dose de 1,5 mg L⁻¹ de BAP em meio MS 50%.

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.

Meio	BAP (mg L ⁻¹)		
	0,5	1,0	1,5
50%	0,0657	0,0691	0
100%	0	0,0252	0,0102
CV(%)	11,691		

Andrade *et al.* (2000) estudando aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) observaram que explantes de segmentos nodal e apical foram regenerados e desenvolveram-se em única brotação; a concentração 4,5 µM de BAP proporcionou maior tamanho das brotações; a concentração de 4,8 µM de ANA promoveu o melhor enraizamento das brotações *in vitro*.

Para cajuí, recomenda-se o meio MS 50% acrescido de 0,5 ou de 1,0 mgL⁻¹ de BAP para induzir o crescimento das brotações, de acordo com os resultados obtidos em nossas condições experimentais.

9.4.6. SUBCULTIVO DO COTILÉDONE

Aos 30 dias, o cotilédone que apresentou intumescimento e indução de raiz foi subcultivado.

Devido ao reduzido número da amostra os dados foram analisados apenas descritivamente.

Todos os cotilédones subcultivados estavam oxidados; a rizogênese não foi induzida; 8% dos explantes subcultivados estavam contaminados e 33% apresentaram calosidade. Não houve diferença na formação de calos em função da posição do explante no meio de cultura.

Pereira *et al.* (1999) estudando *Cucumis melo* L. (melão) avaliaram a regeneração *in vitro* de explantes cotiledonares de diferentes cultivares. Utilizaram três diferentes meios M1 (MS acrescido de 2,2 g L⁻¹ de CaCl₂; 0,84 mg L⁻¹ BAP e 0,26 mg L⁻¹ ABA), M2 (MS 20 g L⁻¹ sacarose, 0,1 mg L⁻¹ ANA e 0,5 mg L⁻¹ BAP) e M3 (MS , 1,0 mg L⁻¹ BAP). Todos os tratamentos induziram a formação de calos na superfície cortada dos cotilédones.

Roustan, Latche & Fallot (1992) e Ficadenti & Rotino (1995) também observaram, para a mesma espécie, que a regeneração foi acompanhada de uma forte calogênese dos explantes. Embora sendo uma regeneração direta, esses autores concluem que isso ocorreu, provavelmente, pelos diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento, sendo ANA e BAP os mais efetivos reguladores de crescimento envolvidos na regeneração, estimulando a formação de gemas e brotações.

Gomes *et al.* (2004); Rillo (1989); Verdeil *et al.* (1992), trabalhando com eixo embrionário de *C. nucifera* L. observaram a formação de calos friáveis nesse explante, nos primeiros 15 dias de inoculação. Outros pesquisadores verificaram variações no tempo de início de formação de calos, de 2 a 3 meses e 6 meses em diferentes explantes. Para a micropropagação do coqueiro, esses mesmos autores verificaram que concentrações mais baixas de 2,4-D (10⁻⁴ e 1,36 x 10⁻⁴ M) foram as mais eficientes na indução à calogênese a partir de eixo embrionário, em um espaço de tempo de 15 a 20 dias.

Em todos os experimentos realizados esperava-se que as taxas de contaminação e oxidação foram maiores do que o esperado. Esses fatores foram limitantes ao sucesso do método de multiplicação *in vitro*.

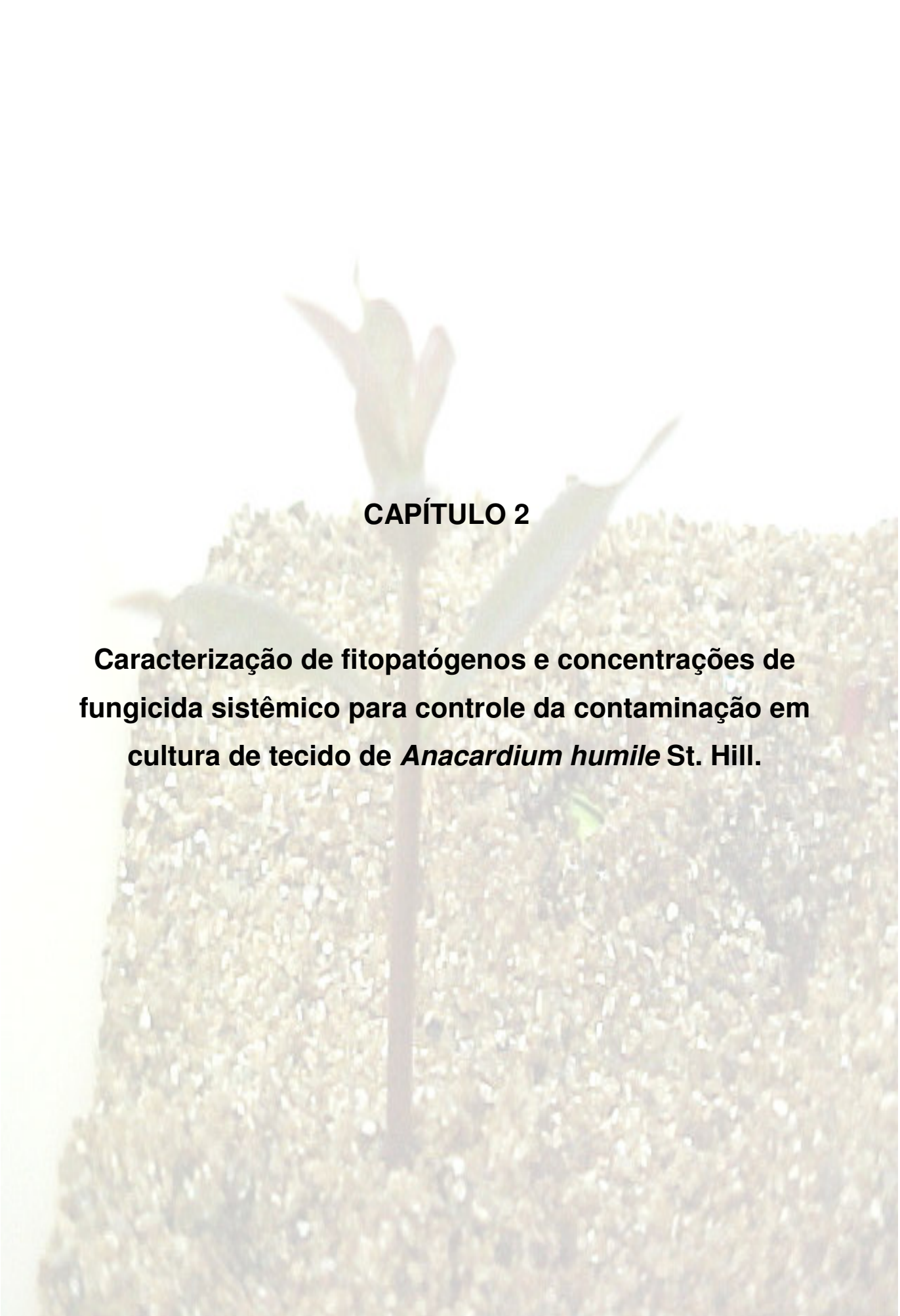
A indução de brotações mais vigorosas e, principalmente, indução de raízes era necessário para que o processo de propagação vegetativa fosse concluído com sucesso, no entanto, as plântulas regeneradas não tinham condições de serem aclimatadas.

Novos estudos devem avaliar o potencial morfogênético de outros explantes e de outras combinações de reguladores de crescimento ou os mesmos utilizados, variando-se as doses de suplementação ao meio de cultura, para se aplicar condições mais adequadas ao processo de multiplicação de plantas de cajuí (*Anacardium humile* St. Hill.) *in vitro*.

10. CONCLUSÕES

- Os processos de desinfestação de explantes foliares, caulinares e cotiledonares provenientes de matrizes do campo de *Anacardium humile* St. Hill. (cajuí) não foram eficientes para promover a regeneração morfogênica da planta, devido aos elevados índices de contaminação e oxidação dos explantes.
- A utilização de álcool 50% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos foi satisfatória para a desinfestação dos frutos provenientes do CENARGEN/EMBRAPA (Bahia).
- As melhores repostas para a formação de calos foram verificadas em ausência de auxina e 5,0 mg L⁻¹ de citocinina (BAP) e na combinação de 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e de 10,0 mg L⁻¹ de BAP.
- O menor percentual de contaminação foi alcançado com a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 5,0 mg L⁻¹ de BAP.
- A oxidação foi um fator limitante para o estabelecimento *in vitro* dessa espécie e pode estar relacionado ao óleo secretado no fruto. O óleo chega a queimar a pele durante a manipulação da castanha.
- O número de brotações aumentou em presença de 5,0 mg L⁻¹ de BAP isento de auxina.
- O comprimento das brotações foi influenciado pelas doses da citocinina. O maior comprimento alcançado foi verificado em meio suplementado por 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 30 dias de avaliação.
- A utilização de 10,0 de BAP sem 2,4-D foi o único tratamento responsivo para os cotilédones de cajuí, promovendo formação de raízes e intumescimento do explante em posição adaxial.
- O meio não influenciou na formação de calosidade.
- O meio MS 100% proporcionou os maiores índices de contaminação e oxidação em relação ao meio MS 50%.

- O número e comprimento de brotos foi maior em meio MS 50% suplementado por BAP na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.
- O cotilédone subcultivado não apresentou respostas que induzam à diferenciação tissular dos explantes.
- Não foi possível a aclimação das plântulas regeneradas.
- A produção clonal *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill exige novas análises e refinamentos de metodologias.

A young Anacardium humile seedling is shown growing in a peat substrate. The seedling has a thin, reddish-brown stem and several small, reddish-brown leaves at the top. The peat substrate is a light brown, granular material. The background is a plain, light-colored surface.

CAPÍTULO 2

Caracterização de fitopatógenos e concentrações de fungicida sistêmico para controle da contaminação em cultura de tecido de *Anacardium humile* St. Hill.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A CONTAMINAÇÃO NA CULTURA DE TECIDOS

Um problema enfrentado na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica na superfície dos explantes. Além dessa contaminação superficial, é freqüente deparar-se com contaminações presentes no interior dos tecidos, que é conhecida como contaminação endógena. Este tipo de contaminação é mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (Teixeira, 2001; Serafini *et al.*, 2002).

Segundo Debergh & Zimmerman (1991) o índice de contaminação pode ser resultante das próprias matrizes ou do manuseio em laboratório, assim, pesquisadores como Herman (1996) se preocuparam com a detecção, identificação e caracterização de contaminantes na cultura de tecidos vegetais, tentando controlá-los e, até mesmo, discutir a influência de microrganismos no estabelecimento da cultura.

A interação entre plantas e microrganismos pode estimular o crescimento vegetal, seja por competição com patógenos ou por indução de efeitos de outros microrganismos úteis, ocasionando benefício às plantas (Arruda, 2000) e entretanto, De Fossard (1985) defende a idéia de que todos os contaminantes são, potencialmente prejudiciais para cultura de tecidos faz-se necessária uma esterilização completa dos explantes.

Nesse sentido, pesquisas contribuem para a identificação de “vitropatógenos”, visando a eliminação dos microrganismos. Vários métodos para o controle da contaminação dos explantes têm sido apontados como, a radiação a laser, água corrente, água quente, dupla desinfecção, desinfecção interna, uso de antibióticos, termoterapia, quimioterapia e uso de múltiplos procedimentos (Herman, 1996).

Os antibióticos e fungicidas são ocasionalmente utilizados para o controle *in vitro* de patógenos. Pollock *et al.* (1983) demonstraram que o uso de certos antibióticos é eficiente no controle de bactérias. Entretanto, o uso deles e de

fungicidas para o controle *in vitro* de bactérias contaminantes, tem sido limitado devido à toxicidade para as células das plantas (Arruda, 2000).

Os principais compostos utilizados na desinfestação do material são o etanol e o cloro. O etanol age na rápida desnaturação protéica e dissolução de lipídios, tendo como desvantagem o fato de ser pouco ativo contra esporos fúngicos. O cloro inativa enzimas e age como oxidante, tem efeito sobre bactérias e sua desvantagem é o odor que irrita os olhos e a pele e, também, sua baixa atividade contra esporos (Pasqual *et al.*, 2002).

1.2. BENOMYL

Uma das maneiras de se controlar as contaminações fúngicas, segundo Thomson (1993), é o uso de benomyl, nome comercial benlate (metil –1 butilcarbomoil – 2 – benzimidazol – carbamato, $C_{14}H_{18}N_4O_3$) que é um fungicida foliar sistêmico e não apresenta problemas de fitotoxicidade, desde que as recomendações de uso sejam respeitadas.

O benomyl ou benlate pode também ser aplicado no solo, ao redor das plantas, sendo absorvido pelas raízes e translocado para outras partes da planta (Issac, 1992). Esse fungicida suprime o crescimento do micélio pela prevenção da divisão nuclear e inibe a mitose por bloquear a formação de β -tubulina e microtúbulos quando os cromossomos estão se separando (Hammersachlag & Sisler, 1973; Howard & Aist, 1980; Davidse, 1986; Issac, 1992).

A introdução de fungicidas com benzimidazole ao final dos anos 60, foi o primeiro e mais eficiente método de controle de alguns fungos como *Botrytis cinera* Pers. Após poucos anos de uso do fungicida, a seleção de resistência já pode ser verificada em algumas espécies de fitopatógenos (Smith, 1988).

Na micropropagação, o benomyl além da proteção do material vegetal e do meio de cultura (Paiva *et al.*, 1999) possui alguns efeitos de regulador de crescimento [Becker, apud Yang (1976)]. Isso se deve, provavelmente, a alterações no ingrediente ativo do fungicida em virtude da autoclavagem do meio de cultura e de

outros componentes desconhecidos do preparo comercial, os quais podem provocar o efeito hormonal do fungicida (Skene, 1972). Thomas (1973) sugere que a atuação hormonal do benomyl possa ser conseqüência de sua semelhança estrutural com as citocininas, entretanto, alguns trabalhos mostram que o fungicida possui efeito inibitório da sobrevivência, multiplicação e crescimento de explantes (Watt, Gauntlett & Blakeway, 1995; Wu, 1996).

O benlate tem sido utilizado em diversos trabalhos no controle de contaminações fúngicas do meio e do material vegetal em várias concentrações, de 50 mg L⁻¹ (Hauptmann *et al*, 1985), 0,6 g L⁻¹ (Yang, 1976) e 2 g L⁻¹ (Haldemann *et al*, 1987).

2. RESUMO

A contaminação é um dos principais problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento *in vitro* de explantes. A utilização de fungicidas no meio de cultura é uma maneira de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos. O benomyl é um fungicida sistêmico utilizado em cultura de tecido vegetal, que é absorvido pelas raízes e translocado para outras partes da planta. Esse trabalho teve por objetivo identificar os fungos existentes em meio MS na micropropagação do *Anacardium humile* St. Hill. e analisar os efeitos da adição de fungicida sistêmico (Benomyl) em meio de cultura, para controle da contaminação, *in vitro*. A identificação dos patógenos foi realizada por meio de lâminas com esporos dos fungos sob microscópio óptico. O fungo de maior prevalência foi o *Aspergillus niger* sendo responsável por 67% da contaminação e o outro fungo foi identificado como saprófita. Após identificação dos patógenos, os esporos foram colocados em meio MS com diferentes concentrações de benomyl. Concentrações acima de 12,0 gL⁻¹ de benomyl foram eficazes no controle do *Aspergillus niger* em meio MS, no entanto, concentrações elevadas podem causar fitotoxicidade aos explantes em cultivo *in vitro*. As concentrações utilizadas não impediram a proliferação do fungo saprófita. Mutações nos códons 198 ou 200 de alguns fungos podem gerar resistência a benzimidazoles, o que permite levantar a hipótese de que *Aspergillus niger* e o fungo saprófita sejam resultantes de mutações.

3. ABSTRACT

Contamination is one of the most common problems in the initial phase of the *in vitro* explants. The use of fungicides is a way of controlling the development of phytopathogens. Benomyl is a systemic fungicide used in cultures of vegetal tissue, which is absorbed by the roots and directed to other parts of the plant. This work aimed at identifying the existing fungi in the MS environment in the micro-propagation of *Anacardium humile* St. Hill. and analyze the effects of the addition of the systemic fungicide (Benomyl) for the control of the contamination, *in vitro*. The identification of the pathogens was done with the use of the razor with sporos of the fungi under optic microscope. The fungus with the biggest prevalence was *Aspergillus niger* being responsible for 67% of the contamination and the other fungus was identified as saprophyte. After identifying pathogens, the spores were put in MS environment with different concentrations of benomyl. Concentrations over $12,0 \text{ g L}^{-1}$ of benomyl were efficient in the control of *Aspergillus niger* in MS environment, however, high concentrations may cause phytotoxicity to the explants *in vitro*. The concentrations used didn't impede the proliferation of saprophyte fungus. Mutations in the codons 198 or 200 of some fungi may generate resistance to benzimidazoles, which allows to raise the hypothesis that *Aspergillus niger* and the saprophyte fungus are results of mutation.

4. OBJETIVO

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*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Devido aos altos índices de contaminação encontrados nos testes iniciais de desinfestação para o estabelecimento *in vitro* do cajuí, materiais contaminados foram selecionados e levados ao Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Uberlândia, para identificação dos patógenos. Foram preparadas lâminas com azul de algodão acrescidos de esporos dos fungos encontrados. As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico (NIKON), aumento de 100x.

Os fungos encontrados no cultivo *in vitro* do cajuí foram identificados, isolados e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com variadas concentrações de benomyl (nome comercial: benlate 50% de princípio ativo - Dupont): 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 11,0; 13,0 e 14,0 g L⁻¹ (Tabela 1).

O meio foi esterilizado em autoclave vertical (FANEM) à temperatura de 121°C, sob a pressão de 1 atm por 20 minutos. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 1 e foram distribuídos 10 mL de solução em cada placa de Petri, sendo o fungicida acrescido ao meio de cultura antes da autoclavagem. Os esporos dos fungos foram isolados e inoculados nos meios em câmara de fluxo laminar (VECO). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 7 repetições.

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

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

Após 7 dias, o crescimento dos fungos em meio MS foi avaliado, atribuindo-se (1) para a formação de colônias e (0) para a ausência de crescimento dos esporos. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização dos programas SANEST com aplicação do teste de *F* a 1 e 5% de probabilidade, sendo transformados em $\sqrt{x + 1/2}$, onde X = média das variáveis analisadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na cultura de tecidos de cajuí, os principais fungos encontrados foram o *Aspergillus niger* (Figura 1), sendo responsável por 67% da contaminação e o outro, identificado como saprófita, foi observado em 33% das amostras contaminadas. A presença de ambos (Figura 2) também foi observada.

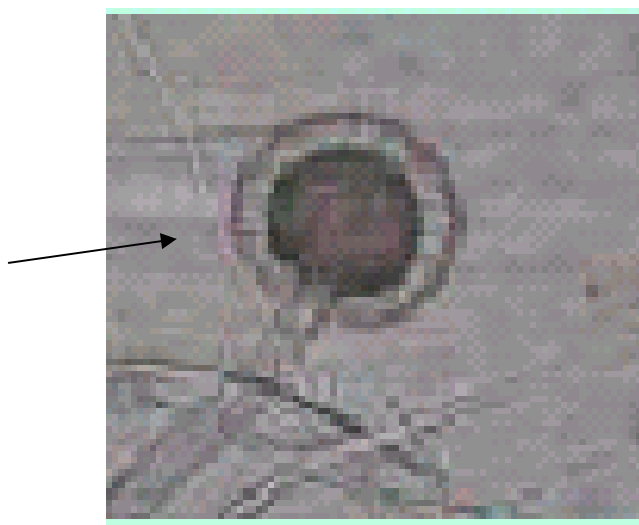


Figura 1: *Aspergillus niger* em meio MS no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) (seta), visto em microscópio óptico (NIKON), aumento de 100x. UFU - Uberlândia, MG – 2005.

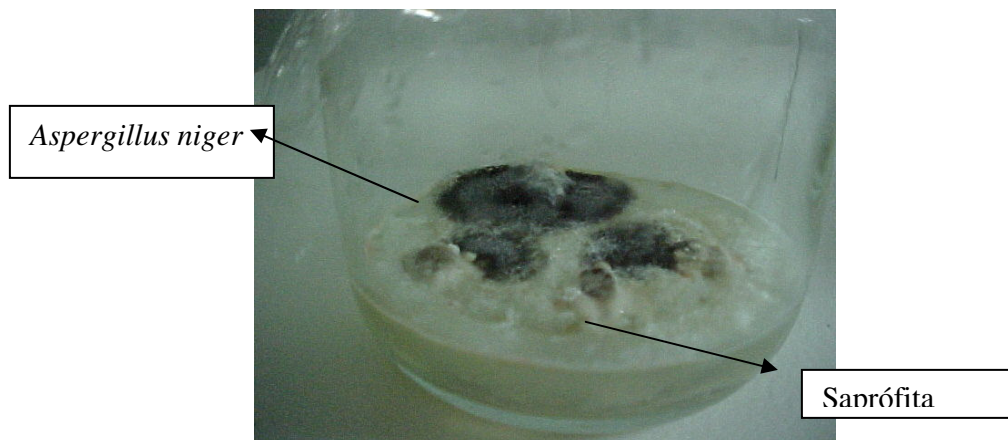


Figura 2: Fungos em meio MS no cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE). Foto em câmera digital (SONY). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

Os fungos que crescem sobre superfícies constituem biopelículas e mostram características fisiológicas particulares, provavelmente, derivadas de uma expressão diferencial de genes (Gutiérrez-Correa, 2003). As biopelículas são sistemas estruturalmente complexos, que estão associados a maior atividade metabólica e, provavelmente, à resistência a certos compostos tóxicos (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003).

Segundo Lihnell (1944) e Huber (1958) os fungos são pouco exigentes com relação à composição nutricional dos meios de cultura, utilizando como fonte de carbono o amido, a glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina.

O meio MS é um meio que contém concentrações relativamente altas de macronutrientes, o que favorece e explica os elevados índices de contaminação considerando a exigência nutricional desses patógenos [Clutterbuck (1974), Rocha (1997) e Jabor *et al.* (2003)].

Com base na análise de variância (Tabela 2), observou-se que não houve diferença significativa para as concentrações de benomyl testadas: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0;

10,0; 12,0; 13,0; 14,0 g L⁻¹ para o fungo saprófita, no entanto, estas mesmas concentrações foram significativas (P<0,01) para o *Aspergillus niger*.

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.

Fonte de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS	
		Saprófita	<i>Aspergillus niger</i>
Benomyl	7	0,0923 ^{ns}	0,3219 ^{**}
Resíduo	48	0,0622	0,0303

ns: não significativo pelo teste *F* (P<0,05);

** : significativo pelo teste de *F* (P< 0,01);

GL : graus de Liberdade.

A concentração de 2,0g L⁻¹ do fungicida foi ineficiente no controle do crescimento de colônias do fungo saprófita, que foi encontrado em todas as placas de Petri inoculadas. Com o aumento das concentrações de benomyl observou-se uma oscilação na formação das colônias entre as concentrações de 4,0 até 10,0 g L⁻¹, sendo a concentração de 12,0 g L⁻¹ a mais eficiente no controle fúngico, quando se observou, em média, 0,23 colônias por placa de Petri (Tabela 3).

Os níveis de benomyl até 8,0 g L⁻¹ não foram eficazes no seu controle da contaminação por *Aspergillus niger*. A dose de 10,0 g L⁻¹ provocou diminuição do número de colônias formadas, encontrando-se 0,23 colônias por placa de Petri e doses a partir de 12 g L⁻¹ foram muito eficazes no combate ao *A. niger*, porém, não para o fungo saprófita (Tabela 3).

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.

Fungo	Benomyl (g L ⁻¹)							
	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	13,0	14,0
Saprófita	1,0000	0,6596	0,3630	0,6596	0,3630	0,2310	0,5058	0,5058
<i>A. niger</i>	0,6596	0,8243	0,8243	0,8243	0,2310	0,0000	0,0000	0,0000
CV (%)	24,641							

Aspergillus spp. são organismos que estão associados a um amplo espectro de infecções em diversos hospedeiros (Reichenberg *et al.*, 2002; Soubani & Chandrasekar, 2002) e a seleção de fungos patogênicos está associada às condições ambientais como pH e temperatura (Araújo & Rodrigues, 2004).

A ocorrência de fungos resistentes às substâncias do grupo dos benzimidazóis já é conhecida (Fernandes *et al.*, 2001), no entanto, não existem pesquisas que relatam a elevada resistência do *Aspergillus niger* às concentrações testadas, como as que encontramos em nossos experimentos.

A Figura 3 mostra que o aumento na concentração de benomyl no meio de cultura até a dose de 4,01 g L⁻¹ proporcionou aumento na formação de esporos, atingindo média de 0,8 colônias do fungo por placa de Petri. A partir dessa dose, a formação de colônias decaiu.

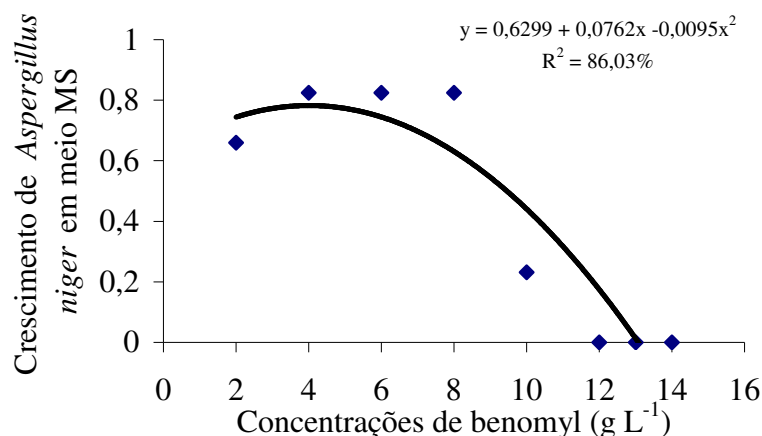


Figura 3: Regressão para o crescimento de *Aspergillus niger* em meio MS com variadas concentrações de fungicida sistêmico benomyl para cultivo *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill (ANACARDIACEAE). UFU - Uberlândia, MG – 2005.

Hauptman *et al.* (1985) utilizaram 50 mg L⁻¹ de benomyl no meio de cultura, controlando a contaminação por *Penicillium*, em culturas de protoplastos de diversas espécies e, em concentrações de 1 a 2 g L⁻¹ do benlate, foi eliminada a

contaminação fúngica de ápices de *Camellia* provenientes de campo (Haldemann *et al.*, 1987).

No estabelecimento, *in vitro*, de segmentos nodais de cajueiro, Silva Neto *et al.* (1993) utilizaram, no meio de cultura, 50 mg L⁻¹ de benlate, concentração que passou a fazer parte de protocolos de micropropagação de outros autores.

Sato *et al.* (2001) utilizaram 200 mg L⁻¹ de benlate na micropropagação de *Celtis* sp., verificando que essa concentração inibe o crescimento de fungos sem causar fitotoxicidade aos explantes.

Fernandes *et al.* (2001) estudaram o comportamento, *in vitro*, de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela em relação às concentrações de benomyl. Verificaram que 1000µgmL⁻¹ de benomyl não inibiu totalmente o crescimento de micélios desse fungo, sendo que os isolados originários de pimentão apresentaram maior sensibilidade ao fungicida em comparação com os demais, mesmo quando submetidos a baixas concentrações do fungicida.

Chiocchio *et al.* (2000) estudando *Glomus mosseae* utilizaram 21,25 µg mL de benomyl, concentração que foi capaz de inibir a germinação de esporos, no entanto, para a inibição do crescimento fúngico de *Glomus caledonicum* a concentração utilizada foi de 10 ng mL do fungicida. Todos os experimentos relatados na literatura, empregaram concentrações de fungicidas muito abaixo dos que foram utilizados com *Anacardium humile*, em nossos experimentos.

Em algumas espécies, a resistência aos benzimidazoles é devida a mutações no códon 198 ou 200 do gene para a β-tubulina (Koenraadt *et al.*, 1992). Nesse sentido alguns estudos moleculares foram realizados. Luck *et al.* (1994) amplificaram fragmentos do gene da β-tubulina contendo os códons 198 e 200 de resistência e sensibilidade ao benomyl a partir de isolados de *Botrytis cinerea* Pers, verificando que quatro isolados não cresceram com a adição de 1µM de benomyl.

May *et al.* (1987) estudando *Aspergillus nidulans*, a partir de hibridização de seu DNA, verificaram dois genes (*ben A* e *tub C*) distintos e divergentes para β-tubulina, que são expressos diferentemente durante os estágios de desenvolvimento

fúngico. Análises por PCR (Polimerase Chain Reaction) mostraram algumas variações nos produtos do isolado dessa espécie, com produtos de 480 pb para *A.nidulans* e de 480 pb e 440 pb para o isolado de *Penicillium digitatum*.

Quanto à resistência em condições de campo, Tu & McNaughton (1979) determinaram 13 biótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* resistentes ao benlate, verificando diferenças quanto à esporulação e crescimento dos diferentes biótipos desse fungo.

Estudando *Cercosporidium personatum*, Mariotto (1985) detectou redução da eficácia de benomyl no controle fúngico, além de o fungo crescer em meio de cultura aveia-ágar contendo 100 ppm do respectivo princípio ativo.

Toledo (1974) relatou que ao pulverizar plantas de banana com benomyl, foram obtidos três isolados de *C. musa* e, que diferiram de outras cepas do fungo em diversas características, incluindo resistência ao benomyl.

Balardini & Rodrigues (1995) ao testarem fungicidas sistêmicos e protetores, detectaram que o benomyl foi o que causou maior efeito inibidor em *C. lindemuthianum*.

Delp (1980) e Georgopoulos & Dovas (1973) apresentaram evidências de que fungicidas sistêmicos como o benomyl, são capazes de induzir seleção em diversos fungos fitopatogênicos. Segundo Delp (1980), os problemas de resistência de fungos ao grupo dos benzimidazoles intensificaram-se, não somente devido ao uso indiscriminado desses produtos nas lavouras mas, também, pelo fato de eles atuarem em um sítio específico de metabolismo dos patógenos e, ainda, porque a maioria deles já contava com cepas resistentes em suas populações originais.

8. CONCLUSÕES

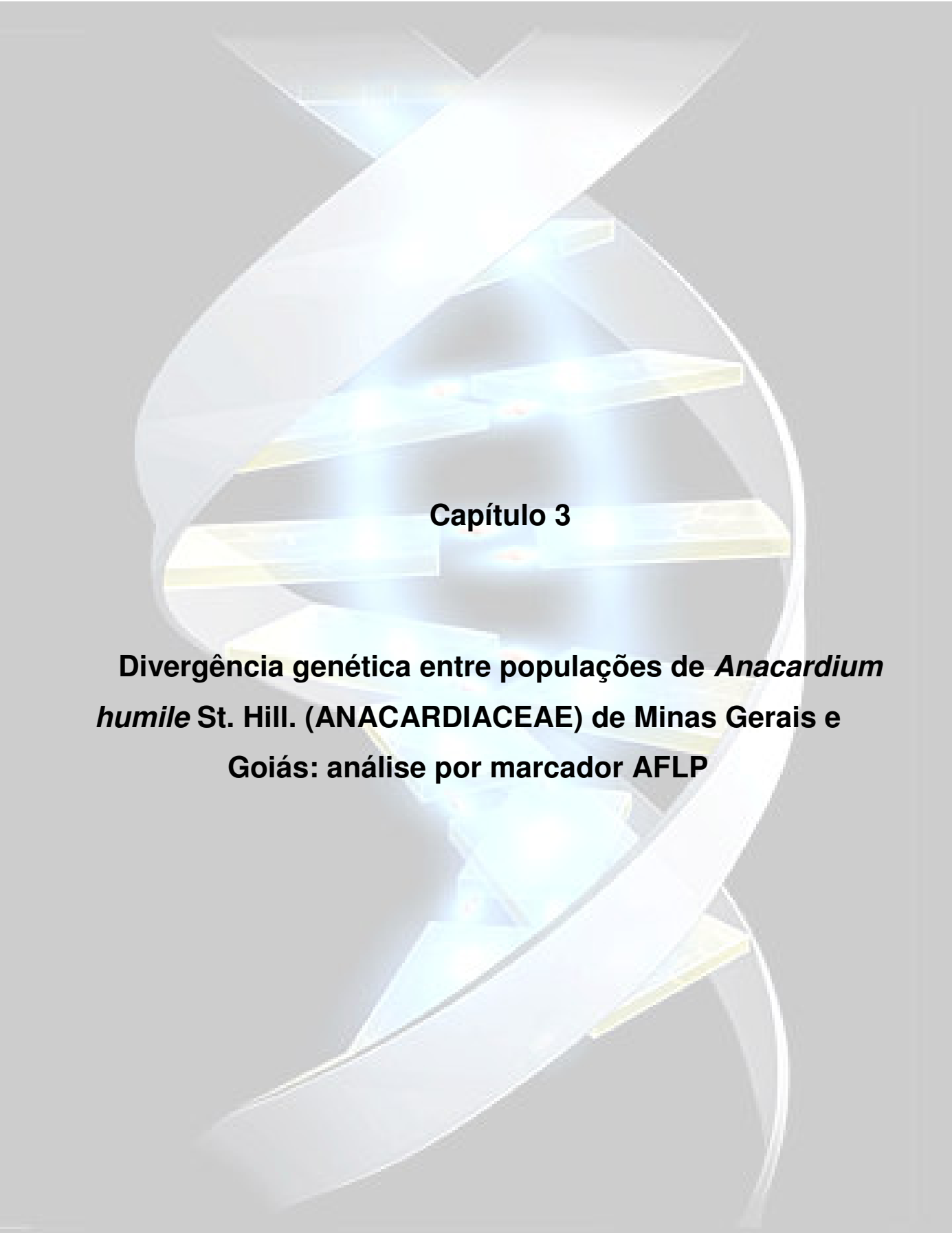
- Nos materiais isolados da cultura de tecidos de *Anacardium humile* foram encontrados fungos saprófita e *Aspergillus niger*.

- O meio MS é um substrato adequado para o desenvolvimento e manutenção dos fungos devido às baixas exigências nutricionais desses patógenos.

- As concentrações de benomyl testadas foram pouco eficientes no controle da contaminação em meio MS.

- Concentrações acima de 12,0 g L⁻¹ de benomyl foram eficazes no controle do *Aspergillus niger* em meio MS, no entanto, essas concentrações são muito altas podendo causar fitotoxicidade aos explantes em cultivo *in vitro*.

- A alta taxa de resistência apresentada pelo fungo saprófita e por *Aspergillus niger* pode sugerir que esses patógenos sejam resultantes de mutações. Nesse sentido, estudos moleculares devem verificar se mutações ocorreram nos mesmos códons (198 ou 200) do gene para a β -tubulina, como se observa em outras espécies de fungos.



Capítulo 3

Divergência genética entre populações de *Anacardium humile* St. Hill. (ANACARDIACEAE) de Minas Gerais e Goiás: análise por marcador AFLP

1. INTRODUÇÃO

Entre as várias técnicas moleculares disponíveis, a técnica Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) também conhecida por SRFA (Amplificação Seletiva de Fragmentos de Restrição), descrita por Zabeau & Vos (1993) tem se mostrado eficiente para análise de diferenças entre indivíduos e populações. Essa técnica alia características de duas outras técnicas, polimorfismo gerado por enzimas de restrição (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) e a amplificação seletiva pelo uso de *primers* com alguns nucleotídeos randômicos na extremidade 3' (RAPD – Random Amplified Polymorphism DNA). A técnica AFLP baseia-se no polimorfismo resultante de mutações de ponto, inversões, deleções e inserções, que levam à perda ou ganho de sítios de restrição, reconhecidos pelas enzimas utilizadas ou na alteração da sequência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários nas extremidades 3' dos *primers* seletivos, complementares ao adaptadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica AFLP empregava, originalmente, autorradiogramas para visualização das bandas geradas, utilizando *primers* marcados com radioisótopos. Cho *et al.* (1996) trabalhando com arroz, utilizaram a técnica AFLP e mostraram que géis corados com prata apresentavam melhor resolução do que quando utilizavam *primers* marcados com ^{32}P . O fato de não utilizar material radioativo foi a grande vantagem do uso da prata. Eles verificaram, também, que bandas selecionadas desses géis podiam ser clonadas após uma única amplificação, por PCR. Lin *et al.* (1997) utilizaram a técnica AFLP e testaram o uso de *primers* marcados com ^{33}P e *primers* marcados com fluorescência, em duas cepas de *Agrobacterium* e duas variedades de soja. As bandas detectadas utilizando radioatividade foram, também, visualizadas por fluorescência em um gel de sequenciamento, tanto para *Agrobacterium* quanto para soja. Com base nos dados de literatura, conclui-se que a técnica AFLP não-radioativo pode ser utilizada para o estudo de organismos com diferentes tamanhos e complexidade do genoma.

Segundo Colowit *et al.* (1996) a técnica AFLP é uma ferramenta valiosa para o mapeamento genético em plantas. Estes pesquisadores compararam o nível de polimorfismo obtido com as técnicas AFLP, RAPD e microssatélites em cultivares de arroz. A AFLP foi a técnica que produziu maior número de bandas informativas.

A técnica AFLP foi utilizada por Cervera *et al.* (1996) para identificação de marcadores moleculares ligados a resistência à ferrugem da folha (*Melampsora larici-populina*) em *Populus*. O material biológico utilizado foi a progênie resultante do cruzamento entre a fêmea *Populus deltóide*, resistente, com o macho *Populus nigra*, susceptível. A segregação resultou numa proporção de plantas resistentes e suscetíveis, que levaram os autores a sugerir que o locus para resistência é simples e dominante (locus MER). Foram analisados aproximadamente, 11.500 fragmentos resultantes da amplificação seletiva utilizando *primers* marcados com biotina e identificados três marcadores ligados ao locus MER. Esses marcadores podem ser utilizados em programas de melhoramento.

Hill *et al.* (1996) avaliaram marcadores AFLP para determinação de relações filogenéticas em *Lactuca* spp. Distâncias genéticas baseadas em AFLP foram estimadas para 44 linhagens morfológicamente diferentes de espécies cultivadas de *Lactuca sativa* e 13 para espécies selvagens de *L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*, *L. perennes* e *L. indica*. A árvore genética baseada em marcadores AFLP mostrou concordância com as relações taxonômicas conhecidas e similares à árvore desenvolvida a partir de dados de RFLP

Breyne *et al.* (1999) estimaram a divergência genética entre e dentro de 21 ecótipos de *Arabidopsis thaliana* por meio da análise AFLP. Em sete dos 21 ecótipos analisados detectaram baixo nível de polimorfismo. Em cinco desses ecótipos distinguiram dois subgrupos. Para os autores, a técnica de AFLP é suficientemente sensível para detectar baixos níveis de variação, mesmo entre genótipos muito próximos.

Muluvi *et al.* (1999) utilizaram marcadores AFLP com o objetivo de subsidiar decisões no manejo, conservação e preparo de programas de melhoramento seletivo de *Moringa oleifera* Lam. Realizaram análises genéticas de sete populações, utilizando quatro pares de *primers* AFLP os quais geraram 236 produtos

amplificados, dentre os quais, 157 eram bandas polimórficas entre ou dentro das populações.

Hehmany *et al.* (2000) compararam *Peronospora paraitica* isolada de *Arabidopsis thaliana* e *Brassica oleraceae* usando a técnica AFLP e ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1 Sequence Analysis). *Fingerprinting* de AFLP e sequências de ITS1 de 27 isolados de *Peronospora parasiitica* (coletados de *Arabidopsis thaliana* ou *Brassica oleraceae*), 5 isolados de *Albugo candida* (coletados dos mesmos hospedeiros de *Capsella bursa-pastoris*), 1 isolado de *Bremia lactuceae* (a partir de *Lactuca sativa*) foram comparados e a análise por AFLP dividiu os isolados em 5 grupos que correlacionaram com espécies taxonômicas e, na maioria dos casos, com o hospedeiro de origem.

Ranamukhaarachchi *et al.* (2000) modificaram a AFLP para desenvolver uma técnica de caracterização genética mais rápida em plantas. As modificações consistiram no uso de uma enzima de restrição, uma molécula adaptadora e um *primer*, incorporando formamida, para gerar bandas mais uniformes e intensas, em gel de agarose. *Uniola paniculata* L., *Pontederia cordata* L., *Cynodon dactylon* L. e *Penstemon heterophyllus* Lindl foram utilizados para determinar a taxa de autopolinização e polinização cruzada entre as espécies de plantas que possam gerar cultivares, ecótipos e indivíduos dentro das populações. Comparando-se as bandas obtidas por RAPD com as obtidas por AFLP modificado, verificou-se que AFLP apresentou um menor número de bandas fracas, um número significativamente maior de loci polimórficos por *primer* e uma ótima reprodutibilidade para *Uniola paniculata* L., evidenciando a maior acuidade dessa técnica para a caracterização genética de plantas.

Behura *et al.* (2000) utilizaram AFLP para distinguir biótipos em *Orseolia oryzae* da Índia. Os biótipos são morfologicamente indistinguíveis, mas apresentam interações diferentes com distintas variedades de arroz. A resistência a essa praga é controlada por um gene do arroz (*Gm2*). Utilizaram 16 combinações de *primers* AFLP que possibilitaram identificar quatro biótipos e, ainda, um marcador que amplifica nos biótipos avirulentos e não amplifica no biótipo virulento para *Gm2*. A partir desse

marcador, fizeram um *primer* SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) capaz de distinguir os biótipos em ensaios de PCR.

Negi *et al.* (2000) investigando variação genética inter e intra-específica em 35 indivíduos de *Withania somnifera* e de *W. coagulans*, por meio de AFLP, obtiveram baixos níveis de variação intrapopulacional e altos níveis de polimorfismos entre as populações, confirmando, também, a habilidade dos marcadores AFLP em detectar, rápida e eficientemente, variações genéticas interespecíficas e intraespecífica.

Colombo *et al.* (2000) utilizaram as técnicas de AFLP e RAPD para verificar a relação filogenética existente no gênero *Manihot*, em *M. esculenta*, *M. flabellifolia* e *M. peruviana*. Verificaram que ambos os marcadores foram ineficientes em diferenciar as duas espécies selvagens, confirmando a semelhança botânica entre elas. Quanto à mandioca cultivada, os resultados revelaram grande proximidade genética entre elas e as espécies selvagens.

Mühlen *et al.* (2000) utilizaram RAPD, AFLP e microssatélites para quantificar a variabilidade genética de etnovarietades de mandioca e examinar a distribuição desta variabilidade entre grupos de diferentes locais de origem (54 etnovarietades originárias de quatro regiões brasileiras) e tipos. Foram analisadas 339 bandas, sendo 134 de AFLP, 156 de RAPD e 49 de microssatélites. A variabilidade dos locos de microssatélites foi superior à detectada por RAPD e AFLP.

Katyar *et al.* (2001) usaram a técnica de AFLP para avaliar a biodiversidade do díptero *Orselia oryzaeu* em uma peste de cereais ocorrida na Ásia. Obtiveram 45 *fingerprintings*, oriundos da amplificação com três pares de primers AFLP, que geraram 261 bandas. Análises de *clusters* por UPGMA separaram as populações em dois grupos distintos. O experimento auxiliou no esclarecimento da origem desses biótipos. O *Fingerprinting* de AFLP foi capaz de detectar, ainda, dimorfismo sexual entre adultos de *O. oryzaeu*.

Quagliaro *et al.* (2001) utilizaram marcadores AFLP para analisar o nível de diversidade dentro e entre populações de *Helianthus argophyllus* coletados na área de Manupo, Moçambique, tanto para fins taxonômicos quanto para melhoramento. Três combinações de *primer* geraram os melhores resultados com 92 fragmentos

polimórficos que foram capazes de discriminar essas populações selvagens endêmicas a partir de *H. annuus* e a partir de um de seus híbridos específicos.

Souza (2001) utilizou AFLP para identificar bandas polimórficas candidatas a marcadores genéticos em *Boophilus microplus* (carrapato bovino), relacionados com a resistência a carrapaticidas.

Sousa (2002) utilizou a técnica AFLP para estudar cultivares de alface. Analisou a distância genética entre a cultivar Uberlândia 10.000 e seus progenitores, a divergência genética entre a oitava e nona geração e a divergência genética entre as plantas com folhas lisa e crespa da cultivar. A técnica se mostrou eficiente para separar genótipos muito próximos, além da identificação de polimorfismo entre cultivares com alta e baixa resistência a septoriose, resultado útil na seleção para a resistência a fungos.

A cultura de tecidos tem sido associada a aberrações moleculares, especialmente cromossômicas, além de as plantas poderem apresentar defeitos fenotípicos. Nesse sentido, Gielis *et al.* (2002) utilizaram o AFLP como um marcador de controle de qualidade de plântulas micropropagadas de bambu, fazendo o monitoramento da identidade clonal da espécie. Os resultados mostraram que, para maior confiabilidade do método, além de marcadores moleculares é necessária utilizar marcadores morfológicos para se monitorar a identidade clonal.

Freitas *et al.* (2004) estudaram a diversidade genética na população natural de *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) originado a partir de 30 árvores de polinização livre da Estação Ecológica Paulo de Faria (SP) para elucidar o sistema de cruzamento dessa espécie. A técnica de AFLP revelou a presença de 137 loci polimórficos, dos quais 11 foram selecionados para o estudo de sistema de cruzamento.

A técnica de AFLP é, freqüentemente, utilizada nos estudos genéticos e oferece a vantagem de produzir grande número de marcadores polimórficos (Gaiotto *et al.*, 1997) que são, rapidamente, detectados pela PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2. RESUMO

A técnica de AFLP é, freqüentemente, utilizada nos estudos genéticos e oferece a vantagem proporcionar grande número de marcadores polimórficos que são detectados por PCR. A espécie *Anacardium humile* possui diferenças fenotípicas marcantes entre populações de uma mesma região e de regiões diferentes. O objetivo desse estudo foi 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 e comparar, molecularmente, por AFLP, as populações que diferem morfológicamente, para verificar se as características resultam de processo de especiação. Foram obtidas 242 bandas monomórficas e 118 bandas polimórficas, apontando grande similaridade genética entre as populações analisadas. As populações do Clube Caça e Pesca(MG) apresentaram divergência genética de 35%, enquanto que a divergência ocorrida no Parque Estadual da Serra de Caldas (GO) foi de 47%. Comparando as populações das duas regiões, o dendograma mostra divergência genética de 58% entre elas. A análise molecular indica que as diferenças morfológicas das populações não são decorrentes de processo de especiação, considerando-se a alta similaridade genética entre elas.

3. ABSTRACT

The technique of AFLP is frequently, used in the genetic studies and offers the advantage of providing a big number of polymorphic markers which are detected through PCR. The *Anacardium humile* species has remarkable phenotype differences among populations of the same region and different regions. The objective of this study was to analyze the genetic divergence between *Anacardium humile* St. Hill. of Caça Pesca e Itororó Club – Uberlândia - MG and the Serra de Caldas State Park – Caldas Novas - Goiás and compare molecularly, through AFLP, the populations which differ morphologically, to verify if the characteristics result from the speciation process. 242 monomorphyc bands and 118 polymorphic bands were obtained, both of which showed very strong genetic similarity between the analyzed populations. The populations of Caça e Pesca Club (MG) showed genetic divergence of 35 %, while the divergence in the Serra de Caldas State Park (GO) was 47 %. Comparing both populations (MG and GO) the dendrogram shows genetic divergence of 58 % between them. The molecular analysis indicates that the morphologic differences between the populations are not resulting from the speciation process, if consider the high similarity between them.

4. OBJETIVOS

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, além de comparar por análises moleculares, AFLP, as populações que diferem morfológicamente, para verificar se as características fenotipicamente contrastantes podem resultar de processo de especiação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Análises de AFLP foram realizadas a partir de plantas de folhas coriácea e pilosa de *Anacardium humile* St. Hill. (cajuí) provenientes do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia – MG e Parque Estadual da Serra de Caldas Novas – GO.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

5.1.1. CLUBE CAÇA E PESCA ITORORÓ DE UBERLÂNDIA – MG

O material biológico 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

As plantas foram, também, 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 (Andrade & Sarmiento, s.d.). As coletas ocorreram no dia 28 de novembro de 2004.

5.2. EXTRAÇÃO DE DNA DA FOLHA DO CAJUI

Nos experimentos foram utilizados “bulks” de DNA de 15 indivíduos de folha coriácea e de 5 indivíduos de folha pilosa.

A extração foi processada de acordo com Doyle & Doyle (1987). Setecentos e cinquenta miligramas (750 mg) de folha fresca de *Anacardium humile* foram colocadas em cadinho e maceradas em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se 2 mL de tampão de extração (PVP 2%, CTAB 2%, NaCl 1,4M, Tris HCl 100 Mm pH 8,0, EDTA 20 Mm, β - mercaptoetanol 3 μ L). Cada amostra foi colocada em microtubo de 2,0 mL e incubada por 1 hora a 65°C. Centrifugou-se por 10 minutos à 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, ao qual foram acrescentados 10 μ L de Rnase (10 mg/mL) incubando-se por meia hora a 37 °C. Posteriormente, o volume do tubo foi completado com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 10 minutos à 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para microtubo completando o volume com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e, novamente, centrifugado por 10 minutos à 10.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo. O volume foi completado com isopropanol gelado e a amostra mantida à 20°C *overnight*. Centrifugação por 15 minutos à 5.000 rpm, descartando o isopropanol e acrescentando etanol 70%. Centrifugou-se, novamente, por 2 minutos a 3.500 rpm. O etanol foi retirado e o material secou em estufa a 37°C. Após secagem, o *pellet* foi ressuspendido em 80 μ L de água milliQ.

5.3. QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO DNA

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro, modelo GBC-UV/VIS911A (SONY), por leitura de absorbância a 260nm. O cálculo da concentração de DNA foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{ABS} (260\text{nm}) \times f_c \times f_d$$

Onde:

[DNA] - concentração de DNA em ng/ μ L

ABS(260) – leitura da absorbância do DNA a 260 nm

Fc – fator de conversão da cubeta (50)

Fd –fator de diluição da amostra (2 μ L de amostra em 998 μ L de água destilada ou TE)

A avaliação da qualidade do DNA foi feita em gel de agarose 0,8%. Uma vez quantificada e avaliada, a amostra foi diluída em água milliQ para a concentração de trabalho de 50 ng/ μ L, a qual foi mantida em freezer a -22°C.

5.4. REAÇÕES DE AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGHT POLIMORPHISM)

Para as reações de AFLP utilizou-se o Kit AFLP™ *Analysis System I* (GIBCO BRL) segundo as recomendações do fabricante.

Os DNAs genômicos das amostras de *Anacardium humile* foram submetidas às etapas prescritas de reações para AFLP, as quais foram realizadas em Termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100.

5.4.1. REAÇÕES DE RESTRIÇÃO

Foram utilizados 350 ng de DNA, 5 μ L de tampão de reação, 2 μ L da solução contendo as enzimas *EcoRI/MseI* e água destilada, completando para o volume final de 25 μ L. As reações enzimáticas foram processadas a 37 °C por 2h e a inativação das enzimas, a 70°C por 15 minutos.

5.4.2. LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES

Ao DNA digerido da etapa anterior, foram adicionados 24µL de solução de adaptadores e 1µL de T4 ligase. A reação de ligação dos adaptadores aos fragmentos de restrição ocorreu a 20°C por 2h. Depois da ligação dos adaptadores, fez-se a diluição da reação na proporção de 1:10 (10µL da reação e 90 de água milliQ) para ser utilizada na pré- amplificação.

5.4.3. REAÇÃO DE PRÉ-AMPLIFICAÇÃO

Utilizou-se 20µL de mix de *primer* (Tabela 1), 1U de Taq polimerase, 2,5µL de tampão com MgCl₂ e 2,5µL do DNA diluído em água milliQ com adaptador. A reação de PCR, em Termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100, consistiu de 20 ciclos: desnaturação do DNA a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers 50°C por 1 minuto e extensão pela Taq polimerase a 72°C por 1 minuto. A reação de pré-amplificação foi diluída na proporção de 1:50 (3µL de reação e 147µL de água milliQ).

Tabela 1: Primers utilizados na reação de pré-amplificação de AFLP [Kit AFLP™ *Analysis System I* (GIBCO BRL)]. UFU, Uberlândia – MG, 2005.

<i>Primers</i>	
PR1 (E-ACC/M-CAG)	PR9 (E-AAG/M-CAC)
PR2 (E-AAC/M-CTC)	PR10 (E-AAG/M-CAA)
PR3 (E-AGC/M-CTA)	PR11 (E-ACA/M-CTT)
PR4 (E-ACC/M-CTA)	PR12 (E-AAC/M-CTT)
PR5 (E-ACT/M-CTT)	PR13 (E-ACA/M-CAG)
PR6 (E-AGC/M-CTT)	PR14 (E-AAG/M-CAG)
PR7 (E-AGC/M-CTC)	PR15 (E-AAC/M-CTA)
PR8 (E-AAC/M-CAA)	PR16 (E-ACT/M-CAT)

5.4.4. AMPLIFICAÇÃO SELETIVA

Foram utilizados 5µl de DNA pré-amplificado diluído, 5µl de um par de primer, 1U de Taq polimerase e tampão com MgCl₂. A reação de PCR foi dividida em 3 etapas. A primeira constou de 6 ciclos, nos quais a desnaturação ocorreu a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 65°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 1 minuto. A segunda etapa constou de 6 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto. A terceira etapa consistiu de 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Para a amplificação seletiva foram utilizados primers do Kit AFLP Starter *Primer* Kit (GIBCO BRL).

5.5. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

A visualização das bandas foi feita em gel desnaturante de poliacrilamida 8%. Foi acrescentado às amostras, metade do volume final de Stop Buffer (Xyleno cianol, azul de Bromofenol, EDTA 10 Mm e formamida). As amostras foram desnaturadas à 90°C por 3 minutos. A coloração foi feita com nitrato de prata e a revelação com carbonato de sódio anidro.

5.6. ANÁLISE DOS DADOS

Foi montada uma matriz binária de acordo com presença (1) e ausência (0) de bandas reproduzíveis e intensas.

Foram realizadas duas repetições de cada gel. As bandas presentes em ambos os géis foram analisadas.

A matriz gerada pelo programa STATISTICA 4,5A (1993) foi usada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de agrupamento. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de Percentagem de Desacordo, que é dado pela fórmula: N'_{AB}/N_T , onde N'_{AB} é o número total de bandas polimórficas entre os genótipos comparados e N_T é o número total de bandas geradas no processo.

A análise de grupos ou “clusters” foi feita pelo método não ponderado de agrupamento aos pares, utilizando médias aritméticas (UPGMA – “Unweighted pair-group method using arithmetic average”), o qual agrupa indivíduos de acordo com a similaridade.

5.7. ANÁLISE FOLIAR DE MICRONUTRIENTES

Amostras de folhas do cajuí do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia - MG e do Parque Estadual da Serra de Caldas - GO foram coletadas nos dias 10 e 14 de março de 2004, respectivamente, para ambos os tipos de folhas (coriáca e pilosa).

As amostras foram levadas ao Laboratório de Análises de Solos e Calcários do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia onde foram realizadas as análises de micronutrientes foliares.

5.8. ANÁLISE DE SOLO

O solo de ambas regiões foi coletado e submetido a análises de textura e micronutrientes.

As análises foram realizadas nos laboratórios de Análise de Solos e Calcários e de Manejo de Solos do Instituto de Ciências Agrárias da UFU.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE FOLHAS DE *Anacardium humile* St. Hill.

O protocolo de Doyle & Doyle (1987) produziu bons resultados possibilitando a extração de DNA de excelente qualidade, conforme mostra a Figura 1. O padrão de amplificação obtido foi adequado para o processamento da AFLP.



Figura 1: Padrão de amplificação de DNA por PCR para AFLP. Gel de poliacrilamida 8%, coloração com prata.

6.2. ANÁLISE MOLECULAR

O número de bandas polimórficas e monomórficas resultantes das 16 combinações de *primers* (Tabela 1, fls 101) é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: *Primers* [Kit AFLP™ *Analysis System I* (GIBCO BRL)] utilizados e número de bandas polimórficas e monomórficas geradas na análise. UFU, Uberlândia - MG, 2005.

<i>Primers</i>	BANDAS	
	Polimórficas	Monomórficas
PR1 (E-ACC/M-CAG)	7	13
PR2 (E-AAC/M-CTC)	4	16
PR3 (E-AGC/M-CTA)	6	14
PR4 (E-ACC/M-CTA)	3	13
PR5 (E-ACT/M-CTT)	4	16
PR6 (E-AGC/M-CTT)	4	14
PR7 (E-AGC/M-CTC)	8	12
PR8 (E-AAC/M-CAA)	13	25
PR9 (E-AAG/M-CAC)	10	14
PR10 (E-AAG/M-CAA)	6	14
PR11 (E-ACA/M-CTT)	11	13
PR12 (E-AAC/M-CTT)	6	14
PR13 (E-ACA/M-CAG)	10	18
PR14 (E-AAG/M-CAG)	10	14
PR15 (E-AAC/M-CTA)	7	17
PR16 (E-ACT/M-CAT)	9	15
Total	118	242

PR – *primer*

Quanto às bandas geradas observa-se que 32,77% são devidas a polimorfismos existentes entre as populações analisadas. Tal quantidade é relativamente alta podendo explicar as diferenças morfológicas encontradas entre e dentro das populações.

Segundo Ferrão (1995) o *Anacardium pumilum* St. Hill. apresenta características morfológicas idênticas às do *Anacardium humile*, o que pode gerar confusão na classificação taxonômica deles.

A caracterização molecular de genótipos tem se tornado uma ferramenta de grande importância para os programas de melhoramento genético, uma vez que cruzamentos entre indivíduos com maior diversidade genética podem contribuir para a ampliação da variabilidade em populações segregantes, possibilitando assim, maior ganho genético (Sousa, 2002; Messmer *et al.*, 1993).

A Figura 2 apresenta o dendograma gerado para os 4 genótipos utilizando 16 *primers*.

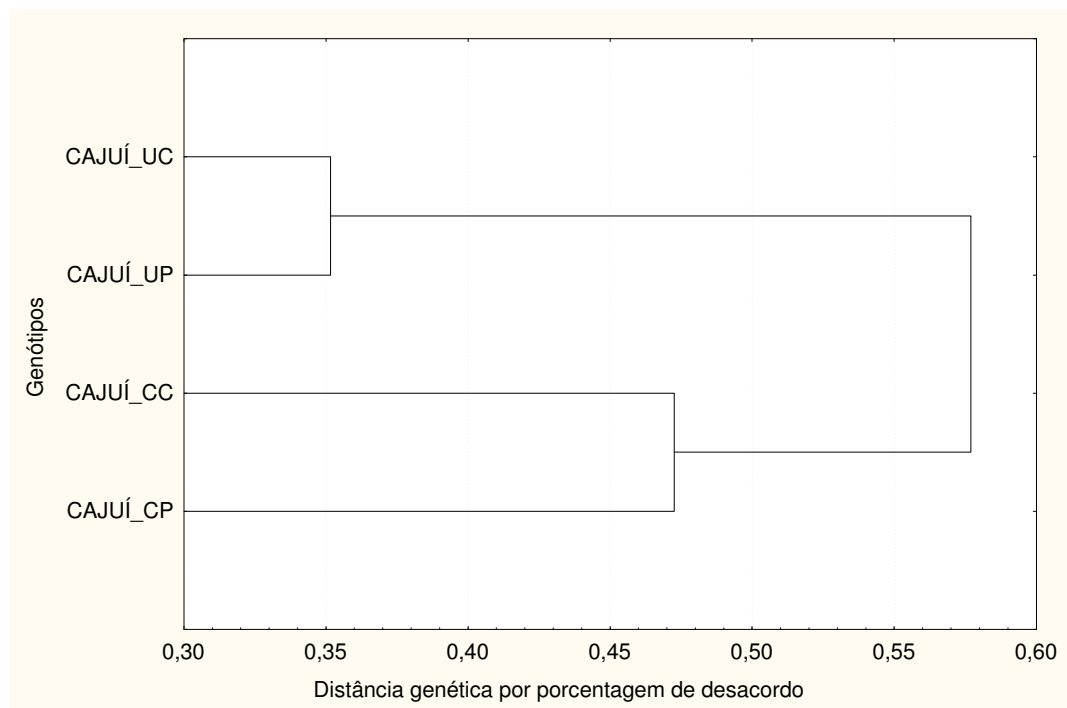


FIGURA 02 - Dendrograma representativo da distância genética por porcentagem de desacordo e agrupamento pelo método de UPGMA entre 4 genótipos utilizando 16 *primers*. UC: Uberlândia/ Clube Caça e Pesca Itororó – folha coriácea; UP: Uberlândia/ Clube Caça e Pesca Itororó – folha pilosa; CC: Caldas Novas/ Parque Estadual da Serra de Caldas Novas – folha coriácea; CP: Caldas Novas/ Parque Estadual da Serra de Caldas Novas – folha pilosa.

As populações do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia – MG apresentaram divergência genética de 35%. Para as populações do Parque Estadual da Serra de Caldas – GO, a divergência genética atingiu 47% e entre as populações das duas regiões estudadas, verifica-se 58% de divergência.

Os dados mostram que existe maior distância genética entre populações de regiões diferentes do que entre as populações da mesma região, o que concorda com os dados de número de bandas monomórficas obtidas em gel de poliacrilamida.

Esses resultados diferem dos encontrados na literatura, pois em outros organismos verifica-se maior divergência genética intrapopulacionalmente do que entre populações distintas (Cosmides *et al.*, 2003).

Segundo esses autores, em dezembro de 2003 pesquisadores americanos mostraram, por análise de DNA, que há maior divergência em uma mesma população do que entre populações de diferentes continentes, com 93 - 95% de diferença dentro de um mesmo grupo contra 3 – 5% entre diferentes populações. Com o advento de tecnologias que permitem sequenciar genes e proteínas tem ficado demonstrado que a variação genética intrapopulacional é, aproximadamente, 10 vezes maior do que a variação entre populações.

A alta similaridade genética apresentada pelas populações não permite afirmar que as diferenças morfológicas sejam devidas ao processo de especiação.

Gielis *et al.* (2002) trabalhando com bambú, também, verificaram elevada similaridade genética entre espécies morfológicamente diferentes, fato que indica a necessidade de se aliar marcadores morfológicos a marcadores moleculares para a taxonomia das espécies.

A menor similaridade genética encontrada entre as populações do Parque Estadual da Serra de Caldas – GO pode estar relacionada com os diferentes ambientes nos quais são encontradas, sugerindo plasticidade fenotípica.

Segundo Falconer (1989) variações podem ser decorrentes tanto das propriedades genéticas da população, quanto da influência do ambiente na expressão de seus genótipos. O efeito provocado pela interação do ambiente e o genótipo é chamado de plasticidade fenotípica. Plasticidade fenotípica retrata, também, a habilidade de um organismo alterar sua fisiologia e/ou morfologia em decorrência de sua interação com o meio ambiente (Scheiner, 1993).

A plasticidade pode ser considerada um mecanismo gerador de variabilidade fenotípica, mostrando que se as divergências fenotípicas geradas dentro de uma população forem mantidas por seleção disruptiva, haverá favorecimento para o surgimento de subespécies, raças ou ecótipos (Via & Lande, 1985; Thompson, 1991).

No Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia – MG, as duas populações são encontradas na mesma localidade, o que não permite inferir sobre a ocorrência desse fenômeno.

Análises de folhas e solos foram realizadas para verificar se as diferenças morfológicas entre as plantas poderiam ser decorrentes de diferenças de micronutrientes, diferença na textura e/ou características do solo das duas regiões.

Entre os fatores que limitam a produção na região do Cerrado, citam-se: a baixa fertilidade natural dos solos, acidez elevada, altos teores de alumínio, óxidos de ferro e manganês trocáveis em solução, baixos teores de matéria orgânica (Lopes, 1984; Malavolta & Kliemann, 1985).

A Tabela 3 mostra que a diferença na quantidade dos micronutrientes é mínima, sendo o cobre (Cu), o ferro (Fe) e o manganês (Mn) os elementos que mais variaram na composição química das folhas.

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).

Micronutrientes	Amostras		
	Caça e Pesca Folha coriácea	Caça e Pesca Folha pilosa	Serra de Caldas Folhas
Nitrogênio (g/kg)	22,0	16,0	13,0
Fósforo (g/kg)	1,0	0,8	0,7
Potássio (g/kg)	2,5	4,0	3,5
Cálcio (g/kg)	0,8	2,3	2,1
Magnésio (g/kg)	0,8	2,0	1,5
Enxofre (g/kg)	1,0	0,9	0,8
Boro (mg/kg)	10,0	14,0	15,0
Cobre (mg/kg)	3,0	2,0	10,0
Ferro (mg/kg)	72,0	156,0	262,0
Manganês (mg/kg)	214,0	646,0	125,0
Zinco (mg/kg)	18,0	11,0	10,0
Silício (%)	0,62	1,17	0,85

N – Digestão sulfúrica;

P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn – Digestão Nitro Perclórico;

B – Colorimétrico;

Azometina – H

Observa-se que o teor de ferro no Cerrado de Goiás é mais elevado do que de Minas Gerais.

A elevada absorção de Fe pelas plantas se deve ao alto teor de óxido de ferro do solo do cerrado. O excesso de Fe^{2+} pode provocar toxidez em arroz e causar deficiência de outros macro e micronutrientes essenciais à nutrição da plantas. A falta de ferro nas plantas produz folhas pálidas, de aspecto vitrificado, enquanto que,

em excesso, as folhas apresentam manchas com pintas pretas (Ponnamperuma, 1972).

As folhas pilosas apresentam, aproximadamente, o triplo da quantidade de Mn observada em folhas coriáceas do Clube Caça e Pesca. Comparando regiões, o cerrado mineiro disponibiliza cinco vezes mais Mn do que o cerrado goiano. O manganês desempenha função importante na planta, destacando-se a participação na fotossíntese (no transporte de elétron específico), no metabolismo do nitrogênio (redução seqüencial do nitrato) e também, nos compostos cíclicos como precursor de aminoácidos aromáticos, hormônios (auxina), fenóis e ligninas (Heenan & Campbell, 1980).

O teor de cobre no Cerrado goiano é maior que o encontrado no Cerrado mineiro. Segundo Rosolem & Boaretto (1989) o cobre participa dos processos enzimáticos das plantas, basicamente na formação da clorofila, sendo que suas formas iônicas (mono ou divalente) atuam no controle de pragas e doenças. Abreu *et al.* (2001) demonstraram que a disponibilidade de cobre é afetada pelo pH do solo, tendendo a diminuir com a sua elevação.

Resultado interessante está relacionada à textura de solos (Tabela 4). O solo do Clube Caça e Pesca é arenoso enquanto que no Parque Estadual da Serra de Caldas o solo é argiloso, diferença que pode explicar a maior divergência entre populações do que intrapopulacionalmente (populações da mesma região).

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

Composição do solo	Amostras		
	Caça e Pesca - rasteira	Caça e Pesca - murundum	Serra de Caldas
Areia grossa(g kg ⁻¹)	40,0%	40,7%	24,1%
Areia fina (g kg ⁻¹)	47,1%	45,2%	20,8%
Silte (g kg ⁻¹)	1,0%	0,7%	11,5%
Argila (g kg ⁻¹)	11,8%	13,3%	43,6%

Caça e Pesca Itororó de Uberlândia – Uberlândia - MG;
Parque Estadual da Serra de Caldas – Calda Novas – GO.

As análises de solo e de micronutrientes do solo não mostraram diferenças significativas que pudessem indicar influência ambiental no processo de especiação (Tabelas 5 e 6). Os resultados da análise de solo não corroboram com os obtidos na análise foliar, para o elemento ferro.

As análises de solo em comparação com os resultados da análise foliar devem ser retomados.

Tabela 5: ANÁLISE QUÍMICA DE MICRONUTRIENTES EM SOLOS

Micronutrientes	Amostras		
	Caça e Pesca - rasteiro	Caça e Pesca - murundum	Serra de Caldas
Boro (mg/dm ³)	0,18	0,28	0,17
Cobre (mg/dm ³)	0,5	0,4	0,4
Ferro (mg/dm ³)	67	67	48
Magnésio (mg/dm ³)	0,5	0,9	0,8
Zinco (mg/dm ³)	0,1	0,1	0,1
S-SO ₄ (mg/dm ³)	1	2	1

Caça e Pesca Itororó de Uberlândia – Uberlândia - MG;

Parque Estadual da Serra de Caldas – Calda Novas – GO

B – BaCl₂ a 0,125% à quente;

Cu, Fe, Mg, Zn – DTPA 0,005M + CaCl 0,01M + TEA 0,1M a pH 7,3;

S-SO₄ – Ca(H₂PO₄)₂ 0,01 mol/L

Tabela 6: ANÁLISE DE SOLO.

Micronutrientes	Amostras		
	Caça e Pesca - rasteiro	Caça e Pesca - murundum	Serra de Caldas
Água (pH)	4,8	4,6	5,0
P (mg/dm ³)	1,1	1,1	1,1
K (mg/dm ³)	9,0	11,0	14,0
Al (cmolc/dm ³)	0,7	0,8	0,5
Ca (cmolc/dm ³)	0,1	0,1	0,1
Mg (cmolc/dm ³)	0,0	0,0	0,0
H+Al (cmolc/dm ³)	3,4	3,6	5,6
SB (cmolc/dm ³)	0,1	0,1	0,2
T (cmolc/dm ³)	0,84	0,95	0,66
T(cmolc/dm ³)	3,56	3,76	5,8
V (%)	4	4	3
M (%)	83	84	76
MO (dag/kg)	0,9	1,3	2,6

Caça e Pesca Itororó de Uberlândia – Uberlândia - MG;

Parque Estadual da Serra de Caldas – Calda Novas – GO

P, K – HCl 0,05N + H₂SO₄ 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.

A análise morfológica e molecular de populações de *Anacardium humile* St. Hill. (cajuí) associada à análise de parâmetros ambientais permitiram entender a menor divergência genética entre populações de um mesmo local do que entre populações de regiões diferentes, mas não indicaram processo de especiação entre as populações analisadas, nas condições em que nossos experimentos foram conduzidos.

7. CONCLUSÕES

- As populações das regiões de Minas Gerais (Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia) e de Goiás (Parque Estadual da Serra de Caldas) apresentam divergência genética de 58%.
- A divergência genética dentro da população de cajuí de Minas Gerais é de 35%.
- A divergência genética intrapopulacional em cajuí de populações de Goiás é de 47%.
- As características morfológicas contrastantes não puderam ser explicadas como resultantes do processo de especiação, com base em marcadores AFLP, é necessário estudos de fluxo gênico e frequência gênica que comprovem a origem das diferenças fenotípicas encontradas nas populações.
- Para a taxonomia dos indivíduos, além de marcadores morfológicos devem ser utilizados marcadores moleculares, que permitam maior precisão na classificação.

CONCLUSÕES GERAIS

A análise de respostas morfogênicas, controle de contaminação e divergência genética em populações de *Anacardium humile* St. Hill. (cajuí) mostraram que:

- Os processos de desinfestação de explantes foliares, caulinares e cotilédones provenientes de matrizes do campo de *Anacardium humile* St. Hill. (cajuí) não foram eficientes para promover a regeneração morfogênica da planta, devido aos elevados índices de contaminação e oxidação dos explantes.
- A utilização de álcool 50% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos foi satisfatória para a desinfestação dos frutos provenientes do CENARGEN/EMBRAPA (Bahia).
- As melhores repostas para a formação de calos foram verificadas em ausência de auxina e 5,0 mg L⁻¹ de citocinina (BAP) e na combinação de 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e de 10,0 mg L⁻¹ de BAP.
- O menor percentual de contaminação foi alcançado com a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 5,0 mg L⁻¹ de BAP.
- A oxidação foi um fator limitante para o estabelecimento *in vitro* dessa espécie e pode estar relacionado ao óleo secretado no fruto. O óleo chega a queimar a pele durante a manipulação da castanha.
- O número de brotações aumentou em presença de 5,0 mg L⁻¹ de BAP isento de auxina.
- O comprimento das brotações foi influenciado pelas doses da citocinina. O maior comprimento alcançado foi verificado em meio suplementado por 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 30 dias de avaliação.
- A utilização de 10,0 de BAP sem 2,4-D foi o único tratamento responsivo para os cotilédones de cajuí, promovendo formação de raízes e intumescimento do explante em posição adaxial.

- O meio não influenciou na formação de calosidade.
- O meio MS 100% proporcionou os maiores índices de contaminação e oxidação em relação ao meio MS 50%.
- O número e comprimento de brotos foi maior em meio MS 50% suplementado por BAP na concentração de 1,0 mg L⁻¹.
- O cotilédone subcultivado não apresentou respostas que induzam à diferenciação tissular dos explantes.
- Não foi possível a aclimação das plântulas regeneradas.
- A produção clonal *in vitro* de *Anacardium humile* St. Hill exige novas análises e refinamentos de metodologias.
- Nos materiais isolados da cultura de tecidos de *Anacardium humile* foram encontrados fungos saprófita e *Aspergillus niger*.
- O meio MS é um substrato adequado para o desenvolvimento e manutenção dos fungos devido às baixas exigências nutricionais desses patógenos.
- As concentrações de benomyl testadas foram pouco eficientes no controle da contaminação em meio MS.
- Concentrações acima de 12,0 g L⁻¹ de benomyl foram eficazes no controle do *Aspergillus niger* em meio MS, no entanto, essas concentrações são muito altas podendo causar fitotoxicidade aos explantes em cultivo *in vitro*.
- A alta taxa de resistência apresentada pelo fungo saprófita e por *Aspergillus niger* pode sugerir que esses patógenos sejam resultantes de mutações. Nesse sentido, estudos moleculares devem verificar se mutações ocorreram nos mesmos códons (198 ou 200) do gene para a β -tubulina, como se observa em outras espécies de fungos.
- As populações das regiões de Minas Gerais (Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia) e de Goiás (Parque Estadual da Serra de Caldas) apresentam divergência genética de 58%.

- A divergência genética dentro da população de cajuí de Minas Gerais é de 35%.

- A divergência genética intrapopulacional em cajuí das populações de Goiás é de 47%.

- As características morfológicas contrastantes não puderam ser explicadas como resultantes do processo de especiação, com base em marcadores AFLP, é necessário estudos de fluxo gênico e frequência gênica que comprovem a origem das diferenças fenotípicas encontradas nas populações.

- Para a taxonomia dos indivíduos, além de marcadores morfológicos devem ser utilizados marcadores moleculares, que permitam maior precisão na classificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABREU, C. A.; FERRERIA, M. E.; BORKERT, C.M. Disponibilidade e avaliação de elementos catiônicos: zinco e cobre. In. FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.R.; RAIJ, B.V.; ABREU, C.A.; eds. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal, CNPq/FAPESP/POTAFOS. 2001. p. 285-308.

ABREU, I. N.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, V. S. K.; MORAIS, A. R.; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O. A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta. Amazônica**, v. 33, p.1-7, 2003.

ALENCAR, A. P.; MELO, N.F. Cultivo *in vitro* de segmentos nodais do umbuzeiro [*Spondias tuberosa* (Arr.) Cam.]. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 19. Recife, PE: *Resumos*. Recife, PE: Seção Regional de Pernambuco, 1995. p.81.

ALESSANDRA, C. B. de A. M.; LILIANA, C. L. S.; ADRIANA, P. M. R.; BEATRIZ, M. J. M. Induction of somatic embryogenesis in *Carica papaya* and subsequent conversion into plants. In: **II Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal**, 1997-**REDBIO** – 1997, Resumo 003.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E.B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.

AMIRATO, P. V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (eds); **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**, v.5, p. 9-29. 1985.

ANDRADE, L.M.C.O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANDRADE, M. W.; de.; LUZ, J.M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciênc. Agrotec, Lavras**, v.24, p.174-180, 2000

ANDRADE, A. F. & SARMENTO, F.N.M. Parque Estadual da Serra de Caldas – plano de Manejo. CTE (Centro Tecnológico de Engenharia Ltda), FEMAGO _ Fundação Estadual do Meio Ambiente, Goiânia.

ARAÚJO, R.; RODRIGUES, A.G. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 4335-4337, 2004.

ARRUDA, S. A. **Produção de propágulos de batata doce *Ipomea batatas* L. obtidos *in vitro* e submetidos a tratamentos prévios com fungicida e bactericida**. 2000. 42p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

BALARDIN, R.S & RODRIGUES, J.C.V. Sensibilidade “in vitro” de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas sistêmicos e protetores. **Fitopatol. Brass**, v.20, p. 494-497, 1995.

BAROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999. 443p.

BEHURA, S.K.; NAIR S.; SAHU, S.C.; MOHAN, M. 2000. Na AFLP marker that differentiates biotypes of the Asian rice gall midge (*Orseolia orizae*, Wood Mason) is

Sex-linked and also linked to avirulence. **Molecular and General Genetics**, v.26, p. 328-334, 2000.

BIODIVERSIDADE brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002. 404p. (Biodiversidade,5).

BRAGA, M. F.; CALDAS, L.S.; HABE, M.H. Estabelecimento da acerola (*Malpighia Glabra L*) *in vitro*: efeito do clone e do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, p. 35-346,1997.

BREYNE, P.; ROMBAUT, D.; GYSEL, A.V. ;MONTAGRE, M.V.; GERATS, T. AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. **Molecular and General Genetics**,. v.261, p. 627-634, 1999.

CARVALHO, C.P.S. **Contribuição ao estudo do Cultivo *in vitro* de *Spondias mombin* L.** 1996. 86p. Monografia de Graduação. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CEVERA, M.T.; GUSMÃO, J.; STEENACKES, M.; PELEMAN, J.; STORME, V.; BROECK, A.V.; MONTAGRE, M.V.; BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus* . **Theoretical Applied Genetic**, v.93, p. 733-737, 1996.

CHIOCCHIO, V.; VENEDIKIAN, N.; MARTINEZ, A.E.; MENENDEZ, A.; OCAMPO, J.A.; GODEAS, A. Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal lenght of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Internatl Microbiol.**, v. 3, p. 173-175, 2000.

CHO Y. G.; BLAIR, W.M.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S.R.. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplifies fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. **Genome**, v.39, p.373-378, 1996.

CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R. C. (Ed). **Handbook of Genetics**. New York: Plenum Publishing, 1974, p. 447-510.

COLOMBO, C., SECOND, G., CHARRIER, A. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. Flabellifolia* and *M. Peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p. 417-423, 2000.

COLOWIT, P.M.; MACKELL, D.J.; ZHANG, Z.; REDONA, E.D. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, v.39, p.969-977, 1996.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS. Assessoria de coordenação ambiental. **Guia ilustrativo de plantas do Cerrado de Minas Gerais**. São Paulo: Nobel, 2001. 96 p.

COSMIDES, L.; TOOBY, J.; KURZBAN, R. Perceptions of race. **Trends of Cognitive Science**, v.7, p.173-179, 2003.

DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual review of phytopathology**, v. 24, p. 43-65, 1986.

DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H.; **Micropropagation. Technology and Application**. 1. ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. 48p.

DE- FOSSARD, R.A. Establishment of laboratory regenerantes underfield conditions. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE:

ENVOLVIM A RESEARCH AGENDA FOR THE ICGB. 1985, New Delhi. **Proceedings...** New Delhi, 1985. p. 193-201.

DELP, C.J. Coping with resistance to plant disease control agents. **Plant. Dis.** v. 64, p. 652-658, 1980. ENTENDENDO a biotecnologia. 2001?. [S. l.]: Universidade Federal de Viçosa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Fundação Biominas. 1 CD-ROM.

DESCHAMPS, C.; INNECCO, R. Oxidação fenólica. Universidade Federal de Lavras, 1991, p.85-90.

DESCHAMPS, C.; PINTO, J.E.B. Controle de oxidação e contaminação para o estabelecimento *in vitro* de brotações de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell. Arg. Var. Schottiana) In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO NA ESAL, 4., 1993, Lavras. **Anais...** Lavras: ESAL, 1993. p. 79.

DODE, L. B.; BOBROWSKI, V. L.; BRAGA, E. J. B.; SEIXAS, F. K.; SCHUCH, M. W. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Laminaceae). **Resumo.?**

DOYLE, J.J AND DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15,1987.

D'SILVA, I. & D' SOUZA. *In vitro* propagation of *Anacardium occidentale* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p. 1-6. 1992.

DUBLIN, P. Tequniques de reproduction végétative *in vitro* at amelioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café, Cacao, Thé**, v. 28, p. 231-244, 1980.

ENTENDENDO a biotecnologia. 2001?. [S. l.]: Universidade Federal de Viçosa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Fundação Biominas. 1 CD-ROM.

FALCONER, D. S. Introduction to quantitative genetics. **Longnon Science and Technology**, New York. 1989. 220p.

FERNANDES, M.do C.A.; SANTOS, A.S.; RIBEIRO, R. L.D. Sensibilidade ao fungicida benomyl *in vitro* de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de frutos de pimentão, jiló e berinjela. **Arq. Inst. Biol.**, v.68, p. 89-95. 2001.

FERRÃO, J. E. M. **O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1995. 299 p.

FERRÃO, J.E.M. **Fruticultura tropical. Espécies com frutos comestíveis**. Instituto de Investigação científica tropical, 1999. 621 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p.

FERREIRA, M. das G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S. de.; CARNEIRO, A. A.; DANIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Rev. Bras. De Fruticultura**, v. 23, p. 473-476. 2001.

FICCADENTI, N.; ROTINO, G. L. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. **Plant Cell, Tissue and organ Culture**, v. 40, p. 293-295. 1995.

FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Mating system of a population of *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão using the fAFLP molecular marker. **Genet. Mol. Biol.**, v.27, p. 78-82, 2004.

FUZETO, A. P.; BARBOSA, A. A. A.; LÔMONACO, C. *Cabralea canjerana* subsp. *Polytricha* (Adri. Juss) Penn. (Meliaceae), uma espécie dióica. **Acta bot, bra.**, v. 15, p. 167- 175. 2001.

GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 95, p. 842-849, 1997.

GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A.; VASIL, I.K. Plant tissue culture media. **In vitro**, v.12, p. 473-478, 1976.

GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G.C. Basal media for plant cell and tissue culture. In: **Plant Cell, Tissue and Organ Culture – Fundamental Methods**. Spronger Lab Manual, p. 301 e 303. 1995.

Gazeta Mercantil, 2003 (26/11/03), O Tempo (20/11/03)

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture. Part 1 – 2 ed. **The Technology**. Edington: Exergetics Limited. 1996. 1574p.

GEORGE, E.F.; SHRRINGTON, P.D. Tissue culture media. In: **Plant propagation by tissue culture**. Eversley, Eastern Press, 1984. 709p.

GEORGOPOULOS, S.G. & DOVAS, C. A serious outbreak of strains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazoles fungicides in Norther Greece. **Plant Dis. Rep.**, V. 57. p. 321-324, 1973.

GIELIS, J.; PEETERS, H.; GILLIS, K.; OPRINS, J. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v. 12, p. 195-203. 2002.

GILL, M. I. S; SINGH, Z.; DHILLON, B. S.; GOSAL, S. S. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration na calluses derived from seedlings explantes of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour X *Citrus deliciosa* Tenora). **Journal of Horticultural Science.**, v. 69, p. 231-236. 1994.

GOMES, K. K. P.; OLIVEIRA, V. C. de; LEDO, A.da S.; ÂNGELO, P. C. S.; COSTA, J. L. S. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Rev. Bras. Frutic.**, v, 26, p. 124-126. 2004.

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

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: **Cultura de tecidos e Transformação Genética de Plantas.** ANTÔNIO CARLOS TORRES, LINDA STYLER CALDAS E JOSÉ AMAURI BUSO – Brasília: Embrapa- SPI/Embrapa – CNPH, p.183-260, 1998.

GUPTA, P. P.; KENDURKAR, S. V.; KURKARNI, V. M.; SHIRGUKAR, M. V.; MASCARINHAS, A. F. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos coconut (*Cocus nucifera* L.) *in vitro*. **Plant Cell Rep**, v. 3. p; 222-225. 1984.

GUPTA, P.P. Erradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.6, p- 33-39, 1986.

GUTIÉRREZ-CORREA, M. Opinion on surface adhesion fermentation. **Agriculture Food Research**, New 1 (em prensa). 2003.

GUTIÉRREZ-CORREA, M.; VILLENA, G. K. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. **Rev. Peru. Biol.**, v. 10, p. 78-87. 2003.

HALDEMAN, J.H.; THOMAS, R.L.; McKAMY, D.L. Use of benomyl and rifanpicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. Japonica*. **HortScience**, v. 22, p.306-307, 1987.

HAMMERSACHLAG, R.S.; SISLER, H.D. Benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC): biochemical cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Pestic. Biochem physiol**, v. 3, p. 42-54. 1973.

HAUPTMANN, R.M.; WIDHOLM, J.M.; PAXTON, J.D. Benomyl: a broad spectrum fungicide for use in plant cell and protoplast culture. **Plant Cell Report**, v. 4, p. 129-132, 1985.

HEENAN, D.P.; CAMPBELL, L.C. Soybean nitrate reductase activity influenced by manganese nutrition. **Plant and Cell Physiology**, Austrália, v. 21, p. 731-736, 1980.

HEGDE, M.; KULASEKARAN, M.; JAYASANKAR, S.; SHANMUGAVELU, K. G. *In vitro* embryogenesis in cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Indian Cashew Journal**, v. 22, p. 125-130. 1994.

HERMAN, B.E. **Recent advances in plant tissue culture: Regeneration, Micropropagation and Media**. New York, Agritech Consultants, Inc., Shrub Oak, 1996, 94p.

HEHMANY, J.; HEDGE, M.; KESSELI, R. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationship in *Lactuca* sp. **Theoretical Applied Genetic**, v.93, p.1202-1210, 2000.

HERNANDÉZ, H.J., RUBIO, L.J. 2002.
<http://www.uv.mx/iiesca/revista2/acerves2.html> **Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad.**

HILL, M.; WITSENBOER, H.; ZABEAU, M.; KESSELI, R.; VOS, P.; MICHELMORE, R. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationship in *Lactuca* sp. **Theoretical Applied Genetic**, v.93, p.1202-1210, 1996.

HOWARD, R.J.; AIST, J.R. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cell. **J.Cell Biol.**, v. 87, p. 55-64, 1980.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell cultures**. v. 1, p. 177-227. 1983.

HUBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektenzuchtender pilze. **Arch Mikrobiol.**, Berlin. v. 29, p. 257. 1958.

http://www.totaltrade.com.br/PAGES/OESTE_BAHIA_3.htm

ISAAC, S. **Plant fungal interactions**. Chapman and Hall. London.1992. 150p.

JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; RODRIGUES, S. B.; MARQUES-SILVA, G. G.; ROCHA, C. L. M. S. C. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta. Scientiarum. Agronomy**, v. 25, p. 497-501. 2003.

KAGEYAMA, P.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, 3, 1993, Serra Negra. **Anais...** São Paulo: FINEP, 1994, v.2, p.1-9.

KATYAR, S.K.; CHANDEL, G.; TAN, Y.; ZHANG, Y.; HUANG, B.; NUGALIYADDE, L. FERNANDO, K. BENTUR, J.S.; INTHAVONG, S.; CONSTANTINO, S. Biodiversity of Asian rice gall midge (*Orselia oryzae* Wood Mason) from five countries examined by AFLP analysis. **Genome**, v.43, p.322-332, 2000.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/EMBRAPA. 1999. p. 519-531.

KISS, E.; KISS, J.; GYULA, I.; HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, v. 30, p. 127-129. 1995.

KOENRAADT, H.; SOMEVILLE, S.C.; JONES, A. L. Characterisation of mutations in the beta tubulin gene of benomyl resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 82, p. 1348-1354, 1992.

KRISHNAN, P. N.; SUDHA, C. G.; SEENI, S. Rapid propagation through shoot tip culture of *Trichopus zeylanicus* Goertn, a rare ethnomedicinal plant. **Plant Cell Reports.**, v. 14, p. 708-7011. 1995.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Biochemistry**, v. 27, p. 969-978, 1988.

LERCH, K. Cooper monooxygenases: tyrosinase and dopamine b-monooxygenases. In: SIEGEL, H (Ed.). **Metal ions in biological systems**. Marchel: Deckker, 1981. p. 143-186.

LIN, J.J.; AMBROSE, M.; KUO J. Chemiluminescent detection of AFLP fingerprints. **Focus**, v.19, p. 36-38p, 1997.

LLOYD, G. & McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of moutain laureal *Kalmia latifolia* by use os shooti tip culture. **Proc. Intern. Pl. Prop. Soc**, v. 30, p. 421-427.1980.

LÓPEZ-NARANJO, H. Hábito de crecimiento y estructura de las diferencias entre madera caulinar y radical. **Bol. Soc. Vem. Cient. Nat**, v. 42, p. 143-178. 1977.

LÓPEZ-NARANJO, H.; PERNÍA, N.E.de. Anatomia y ecologia de los organos subterrâneos de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). **Rev. For. Venez. XXIV**. v. 34, p. 55-76. 1990.

LUCCHESINI, M.; VITAGLIANO, C. Effects of NaCl and CaCl₂ in *Prumus cerasifera* tissue culture. **Acta Horticulturae**, v. 336, p. 109-113. 1993.

LIHNELL, D. Gronmykos fororsaked na Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok.II. **Fisiologia Undersoknigar over gronmykosens swamps**, v. 43, p. 59-90. 1944.

LOPES, A. S. **Solos sob “cerrado”**: caracterísitcas, propriedades e manejo. 2 ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984. 162p.

LUCK, J.E.; GILLINGS, M.R.; STEEL, C.C. Amplification and cloning of a β -tubulin gene fragment from strains of *Botrytis cinerea* resistant and sensitive to benzimidazole fungicides. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.22, p. 173-179, 1994.

MACIEL, A.L. de R. **Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L.** 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, MG.

MALAVOLTA, E.; KLIEMANN, H.J. **Desordens nutricionais no cerrado**. Piracicaba: POTAFOS, 1985. 136p.

MANCINI, R. C. Pior sem ela: lei protege o patrimônio genético. Galileu, Vinhedo, v.137, p.26-27, 2002.

MANTEL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: Uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. 1994. 333p.

MARIOTTO, P.R. Ocorrência de resistência a benomil em *Cercosporidium personatum* (Berk & Curt) Deighton, no Estado de São Paulo de São Paulo. **Biologico**. v. 51, p. 315-317, 1985.

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, v.65, p.103-111, 1990.

MATOS BRITO, A. E. de. **Estudos sobre a regeneração de plantas *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (*V. Sinensis* (L.) Savi ex Hassk) a partir de suspensões celulares**. 1980, 70P. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Ceará.

MAY, G.S.; TSANG, M.L.S.; SMITH, H.; FIELD, S.; MORRIS, N.R. *Aspergillus nidulans* β -tubulin genes are unusually divergent. **Gene**, v. 55, p. 231-243, 1987.

MEDEIROS, C. P. C. de. **Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.).** 1999, 79p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Ceará.

MEDINA, R.; FALOCI, M.; MARASSI, M. A.; MROGINSKI, L.A. Genetic stability in rice micropropagation. **Biocell**, v. 28, p.13-20. 2004.

MELO, B. de; PINTO, J.E.B.P.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus Oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.25, p.1301-1306, 2001.

MESSMER, M.M; MELCHINGER, A. E.; HERMANN, R.R.; BOPPERNMAIER, J. Relationships among early european maize inbreds: I. Comparasion of pedigree and RFLP data. **Crop Science**, v.33, p.944-950, 1993.

MITCHELL, J. D. & MORI, S. A. The cashew and it's relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*) *Memoris New York Bot. Garden*, v. 42, p. 1-76. 1987.

MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A. *et al.*. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin, 1977. p. 109- 126.

MONTEIRO, A. C. B.de; NAKASAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUESZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Sci. Agric**, v. 57, p. 1-6. 2000.

MÜHLEN, G.S., MARTINS, P.S., ANDO, A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, v.57, p.319-328, 2000.

MULUVI, G.M., SPRENT, J.I., SORANZO, N., PROVAN, J., ODEE, D., FOLKARD, G. McNICOL, J.W., POWELL, W. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. **Molecular Ecology**, v.8, p. 463-470, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.

NACHREINER, M. L.; SANTOS, R. R. P. dos.; BOTEON, M. Janelas de Mercado: A fruticultura brasileira no mercado internacional. **Hortifruti/CEPEA**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2004.

NEGI, M.S.; SINGH, A.; LAKSHMIKUMARAN, M. 2000. Genetic variation and relationship among and within *Withania* species as revealed by AFLP markers. **Genome** v.43, p. 975-980, 2000.

OLIVEIRA, C. S.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A. & OLIVEIRA, V. R. Propagação de *Spondias tuberosa* Arr. (umbu) através de cultura de tecidos. **Horticultura Brasileira**. v. 7, p. 69. 1989.

ONAY, A.; PIRINÇ, V.; ADIYAMAN, F.; ISIKALAN, C.; TILKAT, E.; BASARAN, D. *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio *Pistacia vera* L. Cv. "Siirt". **Turk. J. Biol**, v. 27, p. 95-100. 2003.

PAIVA, P.D.O.; MAYER, M.D.B.; KAWAMURA, M.I.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de BAP, Thidiazuron e Sulfato de Adenina na propagação *in vitro* de abacaxi. **Revista Ceres**, v. 46, p. 231-237, 1999.

PALÚ, E. G. **Indução *in vitro* de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L.** 2002. 47 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PARANHOS, T.J., PERRANDO, E., FRANCO, H.E.T., AITA, A.. Regeneração *in vitro* das cultivares de tomate Empine e Monte Carlo. **Revista Horticultura Brasileira**, v. 14, p. 203-207, 1996.

PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R. de.; CAMPOS, K.P. de.; SANTOS, E.C.; CAMPOS, R.J.C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciênc. agrotec.**, v.26, p.71-76, 2002.

PEREIRA, J. E. S.; CITADIN, I.; PETERS, J. A. Efeito de diferentes meios de cultura na regeneração *in vitro* do meloeiro (*Cucumis melo* L.) 'Gaúcho' e 'Hales Best Imperial'. **Ciênc. agrotec.**, v. 23, p. 540-546. 1999.

PIERCE, B. A. **Genetics: A conceptual Approach**. New York, W.H. Freeman and Company. 2003. 709p.

PIERIK, R.L.M. Vegetative Propagation. **In: *In vitro* Culture of Higher Plants**. Newsletter – International Association for Plant Tissue Culture. 1990. p. 183-230.

PIOUS, T. & RANVIDRA, M.B. Shoot tip culture in mango: influence of médium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axeni culture establishment. **Journal of Horticultural Science**, v. 72, p. 713-722, 1997.

PERES, L. E. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plântulas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, p. 44-48, 2002.

PREECE, F.E.; COMPTON, M.E.I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**: 17 – High-Tech and micropropagation I. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.168-189.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reporter**, v. 2, p. 36-39, 1983.

PONNAPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. New York. **Advance in Agronomy**, v. 24, p. 29-88, 1972.

QUAGLIARO, G.; VISCHI, M.; TYRKA, M.; OLIVIERI, A.M. Identification of wild and cultivated sunflower for breeding purposes by AFLP marker. **The American Genetic Association**, v.92, p. 38-42, 2001.

RANAMUKHAARACHCHI, D. G.; KANE, M. E.; GUY, C.L.; LI, Q.B. Modified AFLP technique for rapid genetic characterization in plants. **Biotechniques**, v. 29, p. 858-9, 862-6, 2000

RAWITTSCHER, F.; FERRI, M. G. ; RACHID, M. Profundidade dos solos e vegetação em Campos Cerrados do Brasil Meridional. **An. Acad. Bras. Ciênc**, v.15, p. 267-296. 1943.

REICHENBERG, F.; HABICHT, J.M.; GRATWOHL, A., TAMM, M. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neurotropic patients. **Eur. Resp. J.**, v. 19, p. 734-755, 2002.

RIBEIRO, A.O. **Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba**. 1999. 39p. Monografia do Curso de graduação de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Uberlândia.

RILLO, E.P. A non destructive technique for collecting immature coconut inflorescence for tissue culture. **Philippine Journal of Coconut Studies**, v. 4, p. 16-17. 1989.

ROCHA, A.M.M.R. **Capacidade de regeneração *in vitro* de cotilédones de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) o clone CP 76**. 1998, 54p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.

ROMANO, A.; NORONHA, C.; MARTINS-LOUÇAO, M. A. Influence of growth regulation on shoot proliferation in *Quercus suber* L. **Annals of Botany**, v.70, p. 531-536, 1995.

ROSA, R.; LIMA, S. C. & ASSUNÇÃO, W. L. Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia. **Sociedade & Natureza**, v. 5/6, p. 91-108. 1991.

ROSOLEM, C.A. & BOARETTO, A. E. Avaliação do estado nutricional das plantas cultivadas. In. BOARETTO, A.E. & ROSOLEM, C. A.; eds. **Adubação foliar**. Campinas, Fundação Cargill, 1989. p. 117-144.

ROUSTAN, J. P.; LATCHE, A.; FALLOT, J. Enhancement of shoot regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action. **Journal of Plant Physiology**, v. 140, p. 485-488, 1992.

ROCHA, C. L. M. S. **Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para conidiogênese em *Aspergillus nidulans***. 1997. Tese (Doutorado) — Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A. de; SOUZA, V. C. de. Micropropagação de *Celtis* sp: Controle da Contaminação e Oxidação. **Cerne**, v. 7, p. 117-123. 2001.

SCHEINER, S.M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. Annual Review of Phenotypic Plasticity. **Ann. Rev. Ecol. Systemat.**, v. 24, p. 35-68, 1993.

SCUTTI, M. B.; ZANETE, F. Indução de embriogênese somática em guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). In: **II Encontro brasileiro de Biotecnologia Vegetal**. 1997 – **REDBIO** – 1997. Resumo 052.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. de.; AZEVEDO, J.L. de. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS – Editora da Universidade de Caxias do Sul. 2002. 433p.

SHAN, X.; D, LI.; R. QU. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. **In vitro cellular and developmental Biology-Plant**, v. 36, p. 207-210, 2000.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; MACIEL, A. de R.; MOREIRA, M. A.; DUTRA, L. F. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciênc. agrotec.**, v. 26, p. 1190-1196. 2002.

SILVA NETO, S. P.; MARTINS, G. G.; MIKE, Y.; MATSUMOTO, K. Germinação “*in vitro*” e micropropagação de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). In: Revista Brasileira de Fruticultura, 14., 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1992. p. 53-57.

SILVA NETO, S.P.; MARUTA, I.; TAKAIWA, F. et al. Indução de calos em tecidos de cajueiro (*Anacardium occidentale*). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 109, 1993.

SKENE, K.G.M. Cytokinins like properties of systemic fungicide benomyl. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 47, p. 179-182, 1972.

SMITH, C.M. History of benzimidazole use and resistance. In: **Fungicide resistance in Northern America**. DELP, C.J. ed. Minnesota, United States, America Phytopathological Society Press. 1998. p. 23-24.

SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation of coffee. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.P.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1985. p. 215-232.

SOUBANI, A. O.; CHANDRASEKAR, P.H. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Chest**. v. 121, p. 1988-1999, 2002.

SOUSA, C. S. **Avaliação da germinação, resistência à septoriose e introdução ao estudo molecular da alface (*Lactuca sativa* L.) cv. Uberlândia 10.000**. 2002. 90p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia.

SOUZA, G.R.L. **Variabilidade genética de marcadores AFLP em populações de carrapato *Boophilus microplus* induzida por carrapaticidas**. 2001. 66p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia.

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Palestra...** Goiânia: RedBIO, 2001.

THOMAS, T.H.G. Benzimidazole fungicides on the germination of celery seeds. **Annals of Botany**, v. 65, p. 238-239, 1973.

THOMSON, W.T. Agricultural chemical. **Book IV – Fungicides**, v.23, p. 303-312, 1993.

THOMÉ, G. C. H.; GRESSLER, P. D.; SANTOS, G. dos. Propagação *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.; via organogênese. **Rev.Bras. Agrociência**, v. 10, p. 197-200. 2004.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. **Plant Cell Culture**, v. 15, p. 79-104, 1987.

TOLEDO, A. C.D. Resistência a fungicidas. **Biológico**, v. 40, p. 163-170, 1974.

TORRES, C.A.; CALDAS, S.C.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, v. 1. 1998. 509p.

TU, J.C & McNAUGHTON, M.E. Isolation and characterization of benomyl-resistant biotypes of the delta race of *Colletotrichum lindemuthianum*. Can. J. **Plant Sci**, v. 60, p. 585-589, 1979.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa* AAB) *in vitro*: concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Rev. bras. frutic.**, v. 23, p. 409-412, 2001.

VÁLIO, I. F. M. auxinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal** , v.2, p.61-63. 1986.

VELHO, C.C.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. Cupuassu, new beverage crop for Brazil. In: **Advances in New Crops**. Proceeding of the First National Symposim, New Crops: Research, Developmente, Economics. JANICK,J. SIMOM, J. E. eds. Indianapolis, Indiana, 1988. p. 23-26.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, v. 34, n. 4, p. 507-511. 2004.

VERDEIL, J. L. Plant regeneration from cultured immature inflorescences coconut (*Cocos nucifera* L.): Evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 218-221, 1992.

VIA, S. & LANDE, R. Genotype-environment interactions and the evolution of phenotypic plasticity. **Evolution**, v.39, p. 505-522, 1985.

WATT, M.P.; GAUNTLETT, B. A.; BLAKEWAY, J. Fungal agents in cultures of *Eucalyptus grandis*. South African Forestry Journal, v. 37, p. 607-610, 1995.

WU, W.S. Development and production of biofungicide. **Plant Pathology Bulletin**, v. 43, p. 471-474, 1996.

WANG, P.J.; HUANG, L.C. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. **In vitro.**, v. 12, p. 260-262, 1976.

WANG, J.; SELISKAR, D. M.; GALLAGHER, J. L. Tissue culture and plant regeneration of *Spartia alterniflora*: implications for wetland restoration. **Wetlands**, v. 23, p. 386-393. 2003.

www.brazilianfruit.org

YANG, H.J. Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L. Shoot and root development in culture media. **HortScience**, v. 11, p. 473-474, 1976.

ZABEAU, M.; VOS P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA *fingerprinting*. **European Patent Application EP 534858A1**. 1993.