

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E  
MICROBIOLÓGICOS NO ESTABELECIMENTO *IN*  
*VITRO* DE EXPLANTES DE MANGABEIRA (*Hancornia  
speciosa* Gomes) E NA SUA PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO**

Autora: Juliana Silva Rodrigues Cabral  
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

RIO VERDE- GO  
Fevereiro – 2012

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E  
MICROBIOLÓGICOS NO ESTABELECIMENTO *IN*  
*VITRO* DE EXPLANTES DE MANGABEIRA (*Hancornia  
speciosa* Gomes) E NA SUA PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO**

Autora: Juliana Silva Rodrigues Cabral  
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias.

RIO VERDE - GO  
Fevereiro – 2012

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E  
MICROBIOLÓGICOS NO ESTABELECIMENTO *IN  
VITRO* DE EXPLANTES DE MANGABEIRA (*Hancornia  
speciosa* Gomes) E NA SUA PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO**

Autora: Juliana Silva Rodrigues Cabral  
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

*TITULAÇÃO*: Mestre em Ciências Agrárias – Área de concentração  
Ciências Agrárias – Ciências Agrárias

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria R. Cassiolato  
*Avaliadora externa*  
UNESP - Ilha Solteira

Prof. Dr. Marcos Antônio Soares  
*Avaliador externo*  
UFMT – Cuiabá

Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra C. B. de A.  
Monteiro Hara  
*Avaliadora interna*  
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie  
*Presidente da banca*  
IF Goiano – Campus Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores que ajudaram nessa jornada, ensinando e chamando a atenção sempre que necessário, muito obrigada. EDSON LUIZ SOUCHIE, meu caro, novamente obrigada por orientar nessa viagem que é a microbiologia do solo ou desorientar, sei lá, sempre mostra o lado positivo de tudo, apesar dos atrasos, das correrias de última hora. Ser às vezes um psicólogo em momentos de dúvida, a pessoa com quem podemos contar, ser mais do que um orientador, um amigo. FABIANO GUIMARÃES SILVA, se aprendi como deve ser a postura de uma pessoa que trabalha com pesquisa científica devo agradecer a você, por ensinar o rigor que se deve ter durante a realização de um trabalho, nas avaliações e tabulações de dados, a responsabilidade na condução de um trabalho científico. FLÁVIA DIONÍSIO PEREIRA, obrigada por mostrar que posso ser sempre melhor, por chamar minha atenção sempre que necessário, exigindo de mim o máximo, sei que hoje leio e escrevo um artigo científico com outra perspectiva. E isso devo a você.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde (IF Goiano – Campus Rio Verde), pela oportunidade e infraestrutura, e a todos os servidores que me ajudaram de alguma maneira durante essa jornada, obrigada, mesmo a mais simples ajuda foi a mais importante naquele momento em que era necessária.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

De coração agradeço à minha família por estar ao meu lado ao longo dessa jornada de altos e baixos. MÃE, TATI, NANDO e meu grande amigo-irmão PAULO HENRIQUE que sempre estiveram comigo, incentivando, apoiando, mesmo quando eu passava mais tempo no Instituto do que em casa. Obrigada pela compreensão, carinho e amor.

E como na vida nada é realizado sozinho, agradeço aos meus amigos que estão ao meu lado desde o início, com a amizade, o apoio, os risos, as ajudas naqueles longos

finais de semana e feriados de avaliações de experimentos, o ombro amigo nos momentos difíceis. Muito obrigada aos meus amigos: PAULA, LAIANY, APOLYANA e JADSON por ser minha segunda família. Cada um com sua particularidade, manias e loucuras, mais acima de tudo todos com a amizade única que sei que posso contar a todo momento.

Ao longo dessa jornada novos amigos foram feitos, com risada única de mineira me fazendo sempre rir. MARIALVA, obrigada por estar sempre alegre, “pra cima”, vendo o lado positivo de tudo e de todos, pelos grandes conselhos e por ter me feito craque em cianobactérias. CLARICE, obrigada pelo jeito calmo ao falar e sempre estar disposta a ajudar, ou por me deixar sem graça milhões de vezes e também por deixar fazer parte da vida do menino mais bonito do mundo - ARTHUR (bolota).

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Agrícola: Isabel, Rodrigo, Maria Gabriela, Tiago Moreira, Tiago Rodrigo, Moacir e a todos que já passaram por lá, obrigada por tudo, pelas risadas, pelo apoio e, acima de tudo, por dividir comigo esse amor pela microbiologia do solo.

Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais: Denner, Murilo, Beatriz, Marta, João Paulo, Yasmin, Layara, Cíntia, Mariluzza, Lorena, Ísis, Paulo, Alessandra, ao que chegou por último Clenilson, e o que voltou (Aurélio), valeu por tudo. Terei ótimas lembranças dos momentos incríveis que passei com vocês no laboratório e por aí.

Ao pessoal da Fazenda Gameleira: Bethânia, Bheatriz, Geraldo, Doraci, Geraldin, Márcio Alexandre, Danilo, Seu João, Dona Lurdinha, Dona Maria, Seu Arlindo (*in memoriam*), obrigada pela ajuda nas coletas de fruto, pela hospitalidade e risadas, como adorei conhecê-los e poder desfrutar de momentos maravilhosos com vocês.

Obrigada a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Ver o mundo num grão de areia  
E um Céu numa flor selvagem  
É ter o infinito na palma da mão  
E a eternidade numa hora”*

**William Blake**

## BIOGRAFIA DA AUTORA

JULIANA SILVA RODRIGUES CABRAL, filha de Fernando Rodrigues Cabral e Liamar Azambuja da Silva, nasceu em 29 de março de 1985, na cidade de Quirinópolis, Goiás.

Em dezembro 2005, concluiu o curso Técnico em Alimentos pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde – GO.

Em março de 2006, ingressou no Curso Superior de Tecnologia em Produção de Grãos no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, graduando em janeiro de 2010.

Em março de 2010, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, no Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, concluindo em fevereiro de 2012.

## ÍNDICE

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xix
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
INTRODUÇÃO .....	1
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.1. Mangabeira .....	2
1.1.1. Características .....	4
1.1.2. Valor nutricional .....	4
1.1.3. Formas de exploração .....	5
1.1.4. Formas de propagação .....	5
1.2. Produção de mudas via cultura de tecidos .....	6
1.2.1. Meios de cultivo.....	6
1.2.2. Tipos de vedações .....	8
1.2.3. Constituição do meio e condições de cultivo.....	8
1.2.4. Reguladores de crescimento .....	9
1.2.5. Enraizamento <i>in vitro</i> .....	9
1.2. Microrganismos promotores do crescimento de plântulas .....	10
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	12
OBJETIVOS GERAIS.....	20
CAPÍTULO I - CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTES DE MANGABEIRA VARIANDO CONCENTRAÇÕES DE SAIS E VOLUMES DE MEIOS DE CULTIVO .....	21

RESUMO.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
2.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes de mangabeira .....	25
2.2. Ensaio I – Crescimento <i>in vitro</i> de mangabeira em diferentes meios de cultivo e concentrações de sais .....	25
2.3. Ensaio II – Crescimento <i>in vitro</i> de mangabeira em diferentes volumes de meio de cultivo.....	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes de mangabeira .....	27
3.2. Ensaio I – Crescimento <i>in vitro</i> de mangabeira em diferentes meios de cultivo e concentrações de sais .....	28
3.3. Ensaio II – Crescimento <i>in vitro</i> de mangabeira em diferentes volumes de meio de cultivo.....	34
4. CONCLUSÃO .....	37
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
CAPÍTULO II - OTIMIZAÇÃO DO pH e VEDAÇÃO NO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE MANGABEIRA.....	41
RESUMO.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
2.1. Ensaio I – Influência de diferentes faixas de pH no crescimento <i>in vitro</i> de mangabeira.....	44
2.2. Ensaio II – Tipos de vedações no crescimento <i>in vitro</i> de mangaba .....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1. Ensaio I – Influência de diferentes faixas de pH no crescimento <i>in vitro</i> de mangabeira.....	46
3.2. Ensaio II – Tipos de vedações no crescimento <i>in vitro</i> de mangabeira.....	51
4. CONCLUSÃO .....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
CAPÍTULO III - <i>IN VITRO</i> CULTIVATION OF <i>Hancornia speciosa</i> Gomes: THE PHYSICAL CONSTITUTION OF THE CULTURE MEDIUM, SUCROSE CONCENTRATIONS, AND GROWTH CONDITIONS.....	58
ABSTRACT .....	58
INTRODUCTION .....	60
MATERIALS AND METHODS.....	61

Assay I – Effects of the physical constitution of the culture medium and different concentrations of sucrose on the <i>in vitro</i> germination of <i>Hancornia speciosa</i> Gomes ..	61
Assay II – Effects of different growth conditions on explants of <i>Hancornia speciosa</i> Gomes ..	62
RESULTS AND DISCUSSION ..	63
Assay I – Effects of the physical constitution of the culture medium and different concentrations of sucrose on the <i>in vitro</i> germination of <i>Hancornia speciosa</i> Gomes ..	63
Assay II – Effects of different growth conditions on explants of <i>Hancornia speciosa</i> Gomes ..	65
CONCLUSIONS ..	67
REFERENCES ..	67
CAPITULO IV - CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTES DE MANGABEIRA SOB EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO ..	74
RESUMO.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS ..	77
2.1. Ensaio I – Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira em função da relação ácido indolacético (AIA) e cinetina (KIN) ..	78
2.2. Ensaio II – Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira em função da relação ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP).....	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1. Ensaio I – Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira em função da relação ácido indolacético (AIA) e cinetina (KIN) ..	80
3.2. Ensaio II – Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira em função da relação ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP).....	86
4. CONCLUSÃO ..	93
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..	93
CAPÍTULO V - DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO PARA ENRAIZAMENTO DE EXPLANTES DE MANGABEIRA <i>IN VITRO</i> .....	96
RESUMO.....	96
1. INTRODUÇÃO.....	98
2. MATERIAL E MÉTODOS ..	99
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
4. CONCLUSÃO ..	110
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..	111

CAPÍTULO VI - POPULAÇÃO DE SOLUBILIZADORES E NÃO SOLUBILIZADORES DE FOSFATO EM SOLO DE MANGABEIRA..... 113

RESUMO.....	113
1. INTRODUÇÃO.....	115
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	116
2.1. Isolamento e enumeração populacional de microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio (MSFC), ferro (MSFF) e alumínio (MSFA) e não solubilizadores...	116
2.2. Teste de solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ), ferro (FePO <sub>4</sub> ) e alumínio (AlPO <sub>4</sub> ).....	117
2.2.1. Capacidade dos microrganismos solubilizarem diferentes tipos de fosfatos.....	117
2.3. Quantificação da solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ), ferro (FePO <sub>4</sub> ) e alumínio (AlPO <sub>4</sub> ).....	118
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	119
3.1. Isolamento e enumeração populacional de microrganismos solubilizadores de cálcio (MSFC), ferro (MSFF) e alumínio (MSFA) e não solubilizadores.....	119
3.2. Quantificação da solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ), ferro (FePO <sub>4</sub> ) e alumínio (AlPO <sub>4</sub> ).....	120
4. CONCLUSÕES.....	122
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

CAPÍTULO VII - SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO *IN VITRO* POR MICRORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE MANGABEIRA ..... 125

RESUMO.....	125
1. INTRODUÇÃO.....	127
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	128
2.1. Quantificação da solubilização em meio líquido de fosfato de alumínio (AlPO <sub>4</sub> ), cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ) e ferro (FePO <sub>4</sub> ).....	128
2.2. Curva de calibração dos fosfatos de alumínio (AlPO <sub>4</sub> ), cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ) e ferro (FePO <sub>4</sub> ).....	128
2.3. Curva de solubilização de alumínio (AlPO <sub>4</sub> ), cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ) e ferro (FePO <sub>4</sub> ) por isolados bacterianos e fúngicos.....	129
2.4. Quantificação de produção de ácido indolacético (AIA) por microrganismos isolados de solo de mangabeira.....	129
2.5. Curva de calibração de ácido indolacético (AIA).....	130
2.6. Curva de produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados bacterianos e fúngicos.....	130
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
3.1. Quantificação da solubilização em meio líquido de alumínio (AlPO <sub>4</sub> ), cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ) e ferro (FePO <sub>4</sub> ).....	131

3.2. Quantificação de produção de ácido indolacético (AIA) por microrganismos isolados de solo de mangabeira .....	135
4. CONCLUSÕES .....	137
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	137
CAPÍTULO VIII - INOCULAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MICRORGANISMOS RIZOSFÉRICOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO EM PLÂNTULAS DE MANGABEIRA .....	139
RESUMO.....	139
1. INTRODUÇÃO .....	141
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	142
2.1. Material vegetal .....	142
2.2. Ensaio I – Inoculação de isolados bacterianos e fúngicos em frascos para promoção do crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira.....	142
2.3. Ensaio II - Inoculação de isolados bacterianos e fúngicos em tubos de ensaio para promoção do crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira.....	143
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	144
3.1. Ensaio I – Inoculação de isolados bacterianos e fúngicos em frascos para promoção do crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira.....	144
3.2. Ensaio II - Inoculação de isolados bacterianos e fúngicos em tubos de ensaio para promoção do crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira.....	148
4. CONCLUSÕES .....	152
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	152
CONCLUSÃO GERAL.....	154

## ÍNDICE DE TABELAS

### PÁGINA

#### CAPÍTULO IV

Tabela 1. Diferentes combinações de ácido indolacético (AIA) e cinetina (KIN) no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes). Rio Verde – GO, 2012.....	78
Tabela 2. Diferentes combinações de naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes). Rio Verde – GO, 2012. ....	80
Tabela 3. Comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram), número médio de folhas expandidas, gemas, brotações laterais e formação de calos por plântulas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aos 30 dias de cultivo em meio WPM-50% suplementado com diferentes combinações de AIA + KIN. Rio Verde – GO, 2012. ....	82
Tabela 4. Número médio de folhas expandidas, gemas, brotações e formações de calos por plântulas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aos 60 dias de cultivo em meio WPM – 50% suplementados com diferentes combinações de AIA + KIN. Rio Verde – GO, 2012.....	83
Tabela 5. Comprimento médio de plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram), número médio de folhas expandidas, gemas e formação de calos por plântulas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aos 30 dias de cultivo em meio WPM – 50% suplementado com diferentes concentrações de ANA + BAP. Rio Verde – GO, 2012.....	87
Tabela 6. Número médio de folhas expandidas e formação de calo por explante em plântulas de mangaba ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aos 60 dias de cultivo em meio WPM -50% suplementado com diferentes concentrações de ANA + BAP. Rio Verde – GO, 2012.....	88

## CAPÍTULO V

Tabela 1. Diferentes combinações de ácido indolbutírico (AIB), sacarose e carvão ativado no cultivo *in vitro* em meio WPM – 50% de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Rio Verde- GO, 2012. .... 100

## CAPÍTULO VI

Tabela 1. Quantificação de microrganismos solubilizadores e não-solubilizadores de fosfato, isolados de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em diferentes meios de cultura. Rio Verde – GO, 2012..... 119

Tabela 2. Índice de solubilização (IS) de  $AlPO_4$ ,  $FePO_4$  e  $CaHPO_4$  de isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 12 dias de cultivo *in vitro*. Rio Verde – GO, 2012. .... 121

## CAPÍTULO VII

Tabela 1. Solubilização *in vitro* de fosfato de alumínio ( $AlPO_4$ ), cálcio ( $CaHPO_4$ ) e ferro ( $FePO_4$ ) por microrganismos obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Rio Verde – GO, 2012. .... 131

Tabela 2. Produção *in vitro* de ácido indolacético (AIA) por microrganismos obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Rio Verde – GO, 2012. .... 135

## ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

### INTRODUÇÃO

Figura 1. Planta matriz de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) (A); Planta matriz com frutos (B e C); Detalhe de suas flores (D, E e F); Diferentes formas dos frutos (G e H); Diferentes tamanhos dos frutos (I); Diferentes fases de maturação (J e K); Sementes de mangabeira (L). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. .... 3

### CAPÍTULO I

Figura 1. Início da emergência dos cotilédones em sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) (A); Cotilédones foliares (B); Plântula com cotilédones foliares e presença de raízes adventícias (C); Explante com 90 dias de cultivo *in vitro* (D). Cotilédones foliares, proeminência no hipocótilo e raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra= 10mm. .... 28

Figura 2. Número médio de raízes adventícias em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 30 dias, cultivadas em diferentes meios de cultivo (MS e WPM) e concentrações de sais. Rio Verde - GO, 2012. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre os tipos de meio de cultivo e minúscula entre as concentrações dos sais, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). .... 29

Figura 3. Número médio de folhas expandidas (A), de raízes adventícias (B) e abscisão foliar (C), em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias cultivo *in vitro*, cultivadas em diferentes meios de cultivo (MS e WPM) e concentrações de sais. Rio Verde - GO, 2012. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre os tipos de meio de cultivo e minúscula entre as concentrações dos sais, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). .... 30

Figura 4. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sais nos meios de cultivo MS e WPM. MS-25% (A); MS-50% (B); MS-100% (C); WPM-25% (D); WPM-50% (E); WPM-100% (F). Raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. 31

Figura 5. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sais nos meios de cultivo MS e WPM. MS-25% (A); MS-50% (B); MS-100% (C); WPM-25% (D); WPM-50% (E); WPM-100% (F). Início de formação de calos, pontos amarelos nas folhas, raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 32

Figura 6. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, com presença de folhas senescentes para os meios de cultivo MS e WPM, em duas concentrações de sais (25 e 100%). MS-25% (A); MS-100% (B); WPM-25% (C); WPM-100% (D). Folhas senescentes (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 32

Figura 7. Abscisão foliar em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes volumes e meios de cultivo (MS e WPM). Rio Verde - GO, 2012. .... 34

Figura 8. Número médio de folhas expandidas (A) e abscisão foliar (B) em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes volumes e meios de cultivo (MS e WPM). Rio Verde - GO, 2012. .... 35

Figura 9. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), submetidas a diferentes volumes (mL) e tipos de meio de cultivo (MS e WPM), após 30 dias de cultivo *in vitro*. Meio MS (A). Meio WPM (B). Plântula estiolada (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 36

Figura 10. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), submetidas a diferentes volumes (mL) e tipos de meio de cultivo (MS e WPM), após 60 dias de cultivo *in vitro*. Meio MS (A). Meio WPM (B). Plântula estiolada (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 36

## CAPÍTULO II

Figura 1. Diferentes tipos de vedações: A) Película de PVC; B) Tampão de algodão; C) Tampa plástica. .... 45

Figura 2. Número médio de gemas (A) e comprimento médio de raízes (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), submetidas a diferentes faixas de pH, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Rio Verde - GO, 2012. .... 47

Figura 3. Número médio de gemas em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), submetidas a diferentes pH, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM – 50%. Rio Verde - GO, 2012. .... 47

Figura 4. Diferentes faixas de pH no crescimento *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. A) 3,5; B) 4,0; C) 4,5; D) 5,0; E) 5,5; F) 6,0; G) 6,5; H) 7,0 e I) 7,5. Coloração roxo-avermelhada no caule, brotações laterais e raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 49

Figura 5. Diferentes faixas de pH no crescimento *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. A) 3,5; B) 4,0; C) 4,5; D) 5,0; E) 5,5; F) 6,0; G) 6,5; H) 7,0 e I) 7,5. Coloração roxo-avermelhada no caule e raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 50

Figura 6. Crescimento *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes tipos de vedações. Plântulas aos 30 dias de cultivo *in vitro* em película de PVC (A); tampão de algodão (B) e tampa plástica (C). Plântulas aos 60 dias de cultivo *in vitro* em película de PVC (D); tampão de algodão (E) e tampa plástica (F) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 52

Figura 7. Comprimento médio (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (A) e porcentagem de raízes adventícias (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 30 dias cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações. Rio Verde - GO, 2012. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre os tipos de meio de cultivo e minúscula entre as concentrações dos sais, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). .... 53

Figura 8. Comprimento médio (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (A) e número médio de folhas expandidas (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações. Rio Verde - GO, 2012. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre os tipos de meio de cultivo e minúscula entre as concentrações dos sais, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). .... 54

### CAPÍTULO III

FIGURE 1 - Seedlings of *Hancornia speciosa* Gomes at 35 days of cultivation: A) solid medium with no sucrose; B) solid medium with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose; C) liquid medium with no sucrose; D) liquid medium with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose. The arrows indicate the bulge of the hypocotyl. Bar = 10mm..... 70

FIGURE 2 - Percentage of germination (A), germination rate index (GRI) (B), and average time to obtain 50% of germination (T50) (C) of *Hancornia speciosa* Gomes seeds in different types of culture media and different sucrose concentrations. .... 71

FIGURE 3 - Average explant length (A) and average number of buds (B) of *Hancornia speciosa* Gomes under different cultivation conditions..... 72

FIGURE 4 - *In vitro* growth of *Hancornia speciosa* Gomes after 30 days of cultivation. Liquid medium with agitation (A and B). Necrosed explants in liquid medium with agitation (C and D). Liquid medium without agitation (E, F, G, and H). Solid medium (I and J). Seedlings with few expanded leaves or roots in solid medium (K and L). Bar =10mm. .... 73

## CAPÍTULO IV

Figura 1. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM – 50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T1) 0 AIA + 0 KIN; (T2) 0 AIA + 4,65 KIN; (T3) 0 AIA + 9,29 KIN; (T4) 5,71 AIA + 0 KIN; (T5) 5,71 AIA + 4,65 KIN; (T6) 5,71 AIA + 9,29 KIN; (T7) 11,42 AIA + 0 KIN; (T8) 11,42 AIA + 4,65 KIN; (T9) 11,42 AIA + 9,29 KIN. Plântulas estioladas, formação de calos e entrenós curtos (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 84

Figura 2. Plântulas de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM – 50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T2) 0 AIA + 4,65 KIN; (T3) 0 AIA + 9,29 KIN; (T5) 5,71 AIA + 4,65 KIN; (T7) 11,42 AIA + 0 KIN; (T8) 11,42 AIA + 4,65 KIN. Raízes adventícias, brotações laterais, plântula estiolada e formação de calos (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 85

Figura 3. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T1) 0 ANA+ 0 BAP; (T2) 0 ANA+ 4,44 BAP; (T3) 0 ANA + 8,88 BAP; (T4) 5,37 ANA+ 0 BAP; (T5) 5,37 ANA + 4,44 BAP; (T6) 5,37 ANA + 8,88 BAP; (T7) 10,74 ANA + 0 BAP; (T8) 10,74 ANA + 4,44 BAP; (T9) 10,74 ANA + 8,88 BAP. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra = 10mm. .... 89

Figura 4. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T2) 0 ANA + 4,44 BAP; (T3) 0 ANA + 8,88 BAP; (T6) 5,37 ANA + 8,88 BAP; (T7) 10,74 ANA + 0 BAP; (T9) 10,74 ANA + 8,88 BAP. Brotações laterais, coloração roxo-avermelhada, calos, raízes adventícias e plântula estiolada (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra = 10mm. .... 90

Figura 5. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T2) 0 ANA + 4,44 BAP; (T3) 0 ANA + 8,88 BAP; (T5) 5,37 ANA + 4,44 BAP; (T6) 5,37 ANA + 8,88 BAP; (T8) 10,74 ANA + 4,44 BAP; (T9) 10,74 ANA + 8,88 BAP. Formação de calos (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra= 10mm. .... 91

## CAPÍTULO V

Figura 1. Comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (A), número médio de folhas expandidas (B), gemas (C) e brotações laterais (D) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50% com diferentes composições de meio e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012. .... 102

Figura 2. Porcentagem de enraizamento (A) e comprimento médio de raízes adventícias (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes composições de meio de cultivo e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012. .... 103

Figura 3. Comprimento médio das plântulas (A) e número médio de gemas (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012. 104

Figura 4. Porcentagem de enraizamento (A) e comprimento médio de raízes adventícias (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012. .... 105

Figura 5. Porcentagem de formação de calos em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012. .... 106

Figura 6. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 30 dias de cultivo *in vitro*, cultivadas em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. A) sacarose + carvão ativado + 0  $\mu\text{M}$  de AIB; B) sacarose + carvão ativado + 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; C) sacarose + carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; D) sacarose + carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; E) sacarose + carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; F) sacarose + ausência de carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; G) sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; H) sacarose + ausência de carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; I) sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; J) sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; K) ausência de sacarose + carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; L) sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; M) sacarose + ausência de carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; N) sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; O) sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; P) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; Q) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; R) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 26,6  $\mu\text{M}$  de AIB; S) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; T) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB. Coloração roxo-avermelhada no caule e raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 107

Figura 7. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro*, cultivadas em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. A) sacarose + carvão ativado + 0  $\mu\text{M}$  de AIB; B) sacarose + carvão ativado + 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; C) sacarose + carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; D) sacarose + carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; E) sacarose + carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; F) sacarose + ausência de carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; G) sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; H) sacarose + ausência de carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; I) sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; J) sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; K) ausência de sacarose + carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; L) sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; M) sacarose + ausência de carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; N) sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; O) sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; P) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; Q) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; R) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 26,6  $\mu\text{M}$  de AIB; S) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; T) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB. Plântulas estioladas, raízes adventícias e formação de calos (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm. .... 109

## CAPÍTULO VII

Figura 1. Solubilização de fosfato de  $AlPO_4$  por isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Isolados: A) MA6; B) MF5; C) MF3; D) MA1; D) MA5; E) MC1. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. .... 132

Figura 2. Solubilização de fosfato de  $CaHPO_4$  por isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Isolados; A) MF6; B) MA4; C) MF4; D) MC2; E) MA5; F) MC1. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. .... 133

Figura 3. Solubilização de fosfato  $FePO_4$  por isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Isolados: A) MA1; B) MC1; C) MF5; D) MF6; E) MF7; F) MC2. Fotos; Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. .... 134

Figura 4. Produção *in vitro* de ácido indolacético (AIA) por isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). A) Curva padrão; B) isolado MF2; C) isolado MF5; D) isolado MF7; E) isolado MF3; F) isolado MA2; G) isolado MF6. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. .... 136

## CAPÍTULO VIII

Figura 1. Comprimento médio das plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em frascos contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). .... 145

Figura 2. Número médio de folhas expandidas de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em frascos contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). .... 146

Figura 3. Número médio de gemas de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em frascos contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). .... 147

Figura 4. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em frascos contendo meio WPM-50%, após inoculação de isolados bacterianos e fúngicos. Tratamentos: A) isolado MA6; B) isolado MA5; C) isolado MF6; D) isolado MF7. Formação de raízes adventícias, caule despigmentado, plântula estiolada e folhas expandidas pequenas (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra = 10mm. .... 148

Figura 5. Comprimento médio das plântulas (cm) de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em tubos de ensaio contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). .... 149

Figura 6. Número médio de gemas de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em tubos de ensaio contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). ..... 150

Figura 7. Número médio de brotações de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em tubos de ensaio contendo meio WPM – 50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). ..... 151

Figura 8. Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em tubos de ensaio contendo meio WPM-50%, após inoculação de isolados bacterianos e fúngicos. Tratamentos: A) isolado MF4; B) isolado MA3; C) isolado MA2; D) isolado MF6. Necrose na base da plântula, raízes adventícias, brotações laterais, plântula estiolada e folha senescente (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra = 10 mm. .... 151

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Al.....	Alumínio
AlPO <sub>4</sub> .....	Fosfato de alumínio
B5.....	Gamborg
BAP.....	6-Benzilaminopurina
BCG.....	Verde de bromocresol
BSF.....	Bactéria solubilizadora de fosfato
Ca.....	Cálcio
CaCl <sub>2</sub> .....	Cloreto de cálcio
CaHPO <sub>4</sub> .....	Fosfato de cálcio
DO.....	Densidade óptica
Fe.....	Ferro
FeCl <sub>3</sub> .....	Cloreto Férrico
FePO <sub>4</sub> .....	Fosfato de ferro
FSF.....	Fungo solubilizador de fosfato
GRI.....	The germination rate index
HClO <sub>4</sub> .....	Ácido perclórico
IAA.....	Ácido indolacético
IBA.....	Ácido indolbutírico
IS.....	Índice de solubilização
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	Fosfato de potássio dibásico
KCl.....	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Fosfato de potássio monobásico
KIN.....	Cinetina
MgSO <sub>4</sub> .....	Sulfato de magnésio

MnSO <sub>4</sub> .....	Sulfato de manganês
MS.....	Murashige & Skoog
MSF.....	Microrganismo solubilizador de fosfato
MSFA.....	Microrganismos solubilizadores de fosfato de alumínio
MSFC.....	Microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio
MSFF.....	Microrganismos solubilizadores de fosfato de ferro
NAA.....	Ácido naftalenoacético
NaCl.....	Cloreto de sódio
NH <sub>4</sub> Cl.....	Cloreto de amônio
P.....	Fósforo
PAR.....	Radiação fotossinteticamente ativa
RPCPs.....	Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
T50.....	Average time to obtain 50% of germination
UFC.....	Unidade formadora de colônia
WPM.....	Woody Plant Medium

## RESUMO

CABRAL, Juliana Silva Rodrigues, M.Sc., Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2012. **Otimização de parâmetros físicos-químicos e microbiológicos no estabelecimento *in vitro* de explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e na sua promoção do crescimento.** Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie. Co-orientadores: Dr. Fabiano Guimarães Silva e Dra. Flávia Dionísio Pereira.

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca como uma das mais promissoras espécies arbóreas frutíferas para os programas de exploração sustentável no cerrado. Poucos são os estudos com as plantas frutíferas do cerrado, por isso é necessário o conhecimento de técnicas que viabilizem a disponibilidade de mudas saudáveis visto que algumas das espécies podem ser usadas para formação de pomares em programas de reflorestamento ou para a recuperação de áreas degradadas, requerendo um elevado número de mudas. O melhor entendimento da capacidade e eficiência de microrganismos solubilizadores de fosfato na multiplicação *in vitro* de algumas espécies arbóreas nativas do cerrado, em nível de laboratório, pode maximizar a produção de mudas. Objetivou-se com esse trabalho desenvolver um protocolo para propagação *in vitro* de mangabeira avaliando fatores correlacionados ao crescimento *in vitro* inoculada com bactérias e fungos solubilizadores de fosfato e produtores de fitormônios, para maximizar a produção de mudas para reflorestamento e formação de pomares. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Microbiologia Agrícola do IF Goiano - Campus Rio Verde, GO. Os resultados obtidos demonstram que o volume de 20mL de meio de cultivo foi o mais adequado por proporcionar menor quantidade de senescência. O meio de cultivo WPM 50% promoveu um maior crescimento *in vitro* de plântulas de mangaba. O ajuste de pH de 5,0 proporcionou

maior crescimento *in vitro* de plântulas de mangaba, enquanto o tampão de algodão o maior comprimento médio das plântulas e porcentagem de raízes adventícias. Sementes de mangabeira quando inoculadas em meio líquido WPM-50%, na ausência ou com 15g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou os maiores índices de porcentagem de germinação e vigor. Já o meio líquido sem agitação propicia maior crescimento dos explantes de mangaba, constatado por meio do comprimento médio e número médio de gemas. Para o cultivo de plântulas de mangaba a utilização de 4,65µM KIN em meio favoreceu o crescimento *in vitro* das plântulas. Meio de cultivo com sacarose e sem carvão ativado suplementado com 36,9µM de AIB acarretou em maior crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de mangabeira. Para isolamento de microrganismos solubilizadores de fosfato em solo de mangabeira a utilização de meio de cultura contendo FePO<sub>4</sub> foi o mais indicado. Dentre os 15 isolados obtidos apenas sete demonstraram capacidade para solubilizar as três fontes de fosfato utilizadas, sendo os maiores índices de solubilização de fosfato de alumínio, cálcio e de ferro exibidos pelos isolados, MF5, MA3 e MA6 respectivamente. Maiores taxas de solubilização em meio líquido para fosfato de alumínio e de ferro foram verificados para isolados MC1 e MC2, respectivamente. Enquanto para o fosfato de cálcio, os isolados MC1, MC2, MA5 e MF4 obtiveram as maiores médias. Dentre as fontes de fosfato testadas todos os isolados mostraram os maiores valores de solubilização de fosfato quando o meio de cultura estava suplementado com FePO<sub>4</sub>. A maior produção de AIA foi obtida pelo isolado MF6, e para o cultivo *in vitro* de plântulas de mangabeira quando inoculadas com o isolado MF6 em frascos, proporcionou maior crescimento das plântulas.

**Palavras – chave:** espécie arbórea, micropropagação, solubilização de fosfato, fitormônio.

## ABSTRACT

CABRAL, Juliana Silva Rodrigues, M.Sc., Goiano Federal Institute - Campus Rio Verde - GO, February 2012. **Optimization of physical, chemical and microbiological parameters in the *in vitro* establishment of Mangabeira (*Hancornia speciosa*) explants and its growth promotion.** Advisor: Dr. Edson Luiz Souchie. Co-advisors: Dr. Fabiano Guimarães Silva and Dr. Flavia Dionísio Pereira.

The mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) stands out as one of the most promising fruit tree species for sustainable programs in the cerrado. There are few studies with cerrado fruit trees, so it becomes necessary the knowledge of techniques that enable the availability of healthy seedlings as some species can be used for creating fruits orchards in reforestation programs, or to recover degraded areas, requiring a large number of seedlings. A better understanding of the capacity and efficiency of phosphate solubilizing microorganisms in the *in vitro* multiplication of some cerrado native species, at laboratory, can maximize the seedlings production. The objective of this work was to develop a protocol for *in vitro* propagation of mangabeira evaluating factors related to *in vitro* growth inoculated with phosphate solubilizing and hormone-producing bacteria and fungi, to maximize the seedlings production for reforestation and orchards creation. The tests were carried out at the Laboratory of Plant Tissue Culture and Agricultural Microbiology of IF Goiano - Campus Rio Verde, GO. The results demonstrate that the volume of 20 ml of culture medium was suitable for providing less senescence. The WPM-50% culture medium caused a higher *in vitro* growth of mangaba seedlings. The pH adjustment of 5.0 provided a higher *in vitro* growth of mangaba seedlings, while cotton plug had the highest seedlings average length and adventitious roots percentage. Mangabeira seeds when inoculated in liquid medium WPM-50%, without or with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose gave the highest percentage rates of germination and vigor. The liquid medium without agitation causes the highest

growth of mangaba explants evidenced by the average length and average number of buds. For cultivation of mangaba seedling the use of 4.65 M KIN favored the *in vitro* growth of seedlings. Medium supplemented with sucrose and without activated charcoal supplemented with 36.9  $\mu$ M of IBA resulted in higher *in vitro* growth and rooting of mangaba seedlings. For isolation of phosphate solubilizing microorganisms in mangaba soil the use of culture medium containing FePO<sub>4</sub> was the most indicated. Among the 15 obtained isolates only seven demonstrated ability to solubilize the three phosphate sources used, being the highest rates of solubilization to aluminum phosphate, calcium and iron exhibited by isolated of MF5, MA3 and MA6, respectively. Higher rates of solubilization in a liquid medium to aluminum phosphate and iron were observed for isolated MC1 and MC2, respectively. While to the calcium phosphate the isolates MC1, MC2, MA5 and MF4 obtained the highest average. Among the evaluated phosphate sources all isolates showed the highest values of phosphate solubilization when the culture medium was supplemented with FePO<sub>4</sub>. The highest IAA yield was obtained by MF6 strain, and for the *in vitro* cultivation of mangaba seedlings when inoculated with the MF6 strain in vials provided higher seedling growth.

**Key words:** tree species, micropropagation, phosphate solubilization, phytohormone

## INTRODUÇÃO

O cerrado é considerado a savana de maior biodiversidade vegetal do mundo, com uma área de 204 milhões de hectares, distribuídos principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal, correspondendo a aproximadamente 22% do território brasileiro. A região sudoeste Goiana é a que possui, atualmente, a menor área de preservação do Estado (SILVA et al., 2001; MACHADO et al., 2004).

As frutíferas do cerrado têm alto valor nutritivo, sendo utilizadas para o consumo *in natura* ou para a produção de doces, geleias, sucos e licores, além de suas folhas e cascas serem utilizadas na medicina popular, o que beneficia pequenos agricultores e comunidades rurais. Por causa do desmatamento, áreas de preservação estão cada vez mais raras e o comércio de frutos deste bioma é feito exclusivamente a partir da coleta de plantas nativas.

Estas frutíferas podem ser usadas na formação de pomares domésticos e comerciais, além de serem utilizadas com sucesso na recuperação de áreas desmatadas ou degradadas, no plantio intercalado com reflorestas, no enriquecimento da flora, no plantio em parques e jardins, no plantio em áreas acidentadas, para controle de erosão e no plantio de áreas de proteção ambiental. Entre as árvores frutíferas nativas do cerrado, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca como uma das mais promissoras para os programas de exploração sustentável (CALDAS et al., 2009).

Visto que são poucos os estudos com as plantas frutíferas do cerrado, torna-se necessário o conhecimento de técnicas que viabilizem a disponibilidade de mudas sadias, visto que algumas das espécies podem ser usadas em diferentes programas, o que requer um elevado número de mudas.

A técnica de micropropagação possibilita a multiplicação em massa de mudas com características geneticamente superiores, uniformes, livres de patógenos, em espaço físico reduzido e em curto período de tempo. Entretanto, tais mudas são altamente sensíveis às variações externas e dependentes da fertilidade do substrato, exigindo extremo cuidado em seu manejo, principalmente na fase de aclimatização. Não obstante, a cultura de tecidos também elimina os microrganismos associados ao tecido vegetal, que podem melhorar o desempenho da planta, sob condições de estresse, além de aumentar seu rendimento (SOARES et al., 2009; CAMOLESI et al., 2010; COSTA et al., 2010; MORAES et al., 2010).

Os microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) inorgânicos desempenham importante papel no suprimento de fósforo (P) às plantas. A ação solubilizadora tem sido associada principalmente à produção de ácidos orgânicos (BARROSO & NAHAS, 2008; ALVES & SILVA FILHO, 2009). A inoculação de MSF, aliados ou não a outros microrganismos benéficos do solo, pode incrementar o desenvolvimento vegetal (NARLOCH et al., 2002).

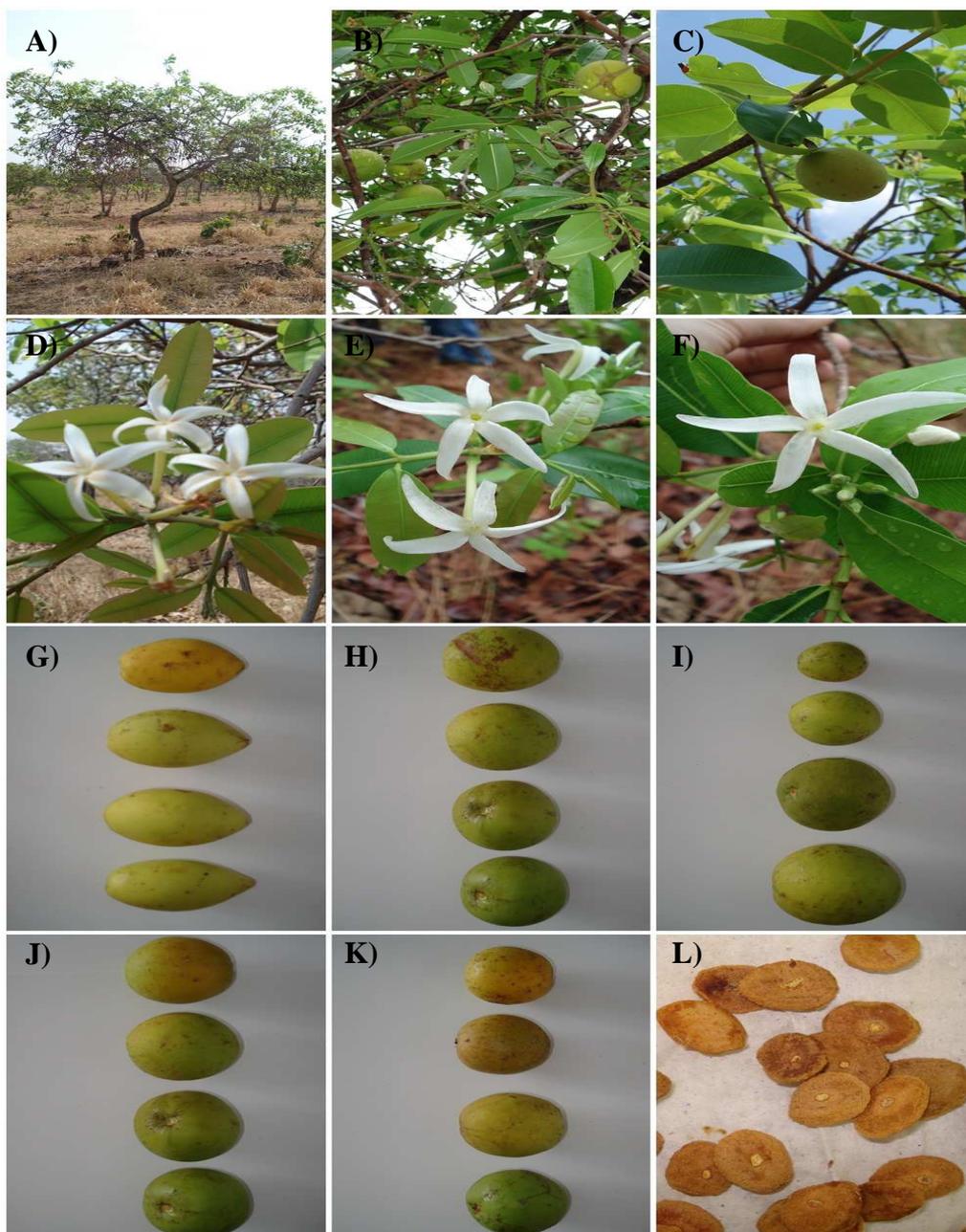
Um melhor entendimento da capacidade e eficiência de MSF na multiplicação *in vitro* de algumas espécies arbóreas nativas do cerrado, em nível de laboratório, pode maximizar a produção de mudas a serem utilizadas em programas de reflorestamento e formação de pomares.

Desta forma, com este trabalho, objetivou-se estabelecer um protocolo para propagação *in vitro* de mangabeira inoculadas com microrganismos promotores de crescimento vegetal.

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1. Mangabeira**

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie arbórea, de porte médio, com 2 a 10 m de altura, podendo chegar até 15 m (Figura 1A), frutífera, lactescente, de clima tropical, nativa do Brasil, pertence à Ordem Gentianales e à família Apocynaceae. Seu nome em tupi-gurani significa “coisa boa de comer”. Desenvolve-se em solos com baixa fertilidade, ácidos e bem drenados (BARROS et al., 2006; VIEIRA et al., 2006; BASTOS et al., 2007; SOARES et al., 2007b; ANJOS et al., 2009; BARROS et al., 2010).



**Figura 1.** Planta matriz de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) (A); Planta matriz com frutos (B e C); Detalhe de suas flores (D, E e F); Diferentes formas dos frutos (G e H); Diferentes tamanhos dos frutos (I); Diferentes fases de maturação (J e K); Sementes de mangabeira (L). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012.

Sua distribuição ocorre nas regiões de cerrado do centro-oeste, sudeste, norte e nordeste do Brasil, com maior abundância nas áreas de tabuleiros e baixadas litorâneas do nordeste, onde se encontra quase a totalidade da produção nacional. Os estados da Paraíba, Bahia e Sergipe figuram entre os maiores produtores do país, os frutos são

obtidos principalmente de forma extrativista (BARROS et al., 2006; SOARES et al., 2007b; SANTOS et al., 2010; MARINHO et al., 2011; SÁ et al., 2011).

A incorporação da mangaba em sistemas de horticultura tem sido proposta como um meio para contribuir para a sua conservação e, também, reduzir a pobreza em áreas em que a mangaba é nativa e cresce satisfatoriamente (CALDAS et al., 2009). É comum em terrenos arenosos e de baixa fertilidade, que esta espécie produza frutos até duas vezes por ano. Os frutos amadurecem de outubro a novembro e as sementes são consideradas recalcitrantes, sendo sensíveis a perda de água e incapazes de manter alta viabilidade quando armazenadas hidratadas (ALMEIDA et al., 1998).

### **1.1.1. Características**

As folhas são simples, alternas e opostas, de forma e tamanho variado, pilosas ou glabras. As flores são hermafroditas e brancas (Figura 1D, 1E e 1F). Produz de 100-400 frutos, com peso variando de 5 a 50g no nordeste e de 30 a 260g no cerrado (SILVA et al., 2001; VIEIRA et al., 2006).

Os frutos são do tipo baga, de tamanho, formato e cores variados, normalmente elipsoidais ou arredondados, amarelados ou esverdeados, com pigmentação vermelha ou sem pigmentação (Figura 1G, 1H, 1I, 1J e 1K). Cada fruto tem 8 a 35 sementes compridas de forma discoide irregular, achatadas, com hilo central, com a testa de coloração castanho-clara (Figura 1L), fina e o endosperma branco triangular (SILVA et al., 2001; BARROS et al., 2006; SOARES et al., 2007a; SANTOS et al., 2010).

A polpa é de coloração branca, mole, fibrosa, agridoce e aromática, sendo 80% aproveitada na forma de sucos, sorvetes, licores, doces, vinho e vinagre ou consumida *in natura* (COSTA et al., 2005; BARROS et al., 2006; SAMPAIO & NOGUEIRA, 2006; SANTOS et al., 2009).

### **1.1.2. Valor nutricional**

Seu fruto tem boa digestibilidade e valor nutritivo, sua polpa é rica em vitamina C, N, Fe, P, Ca, lipídeos e com teor de proteína (1,3 a 3%) superior ao da maioria das frutíferas (PINHEIRO et al., 2001; CALDAS et al., 2009; SANTOS et al., 2009; BARROS et al., 2010).

### 1.1.3. Formas de exploração

A mangaba produz um fruto bastante apreciado pelas suas excelentes características físicas, aroma e sabor, associado ao elevado valor nutricional. Ela pode ser consumida *in natura* ou utilizada no preparo de geleias, sorvete, licor, doce, refresco, vinho e vinagre. Por ser uma planta laticífera, a presença do látex nos frutos é uma vantagem para a preparação de sorvetes e geleias (MARINHO et al., 2004; SAMPAIO & NOGUEIRA, 2006; ANJOS et al., 2009; CALDAS et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

Na medicina tradicional o látex obtido do tronco da mangabeira é usado para proteção contra doenças gástricas e tuberculose, além de ser usado para estimular a função hepática e tratar luxações, acne, verrugas, diabetes, hipertensão e certos tipos de inflamações. Suas folhas e raízes também são utilizadas com adstringente, tônico estomacal e no tratamento de reumatismo (MACHADO et al., 2004; FERREIRA et al., 2007; ENDRINGER et al., 2009; MARINHO et al., 2011).

Sua madeira é utilizada na carpintaria, para confecção de caixas e para produção de carvão. A planta é laticífera e sua borracha tem potencial de uso industrial, as características físico-mecânicas conferem à sua borracha boas características tecnológicas, podendo ser usada em aplicações comerciais. Na região do cerrado a borracha é utilizada para impermeabilizar tecidos e confeccionar bolas. Além disso, a mangabeira pode ser usada para o reflorestamento de áreas degradadas ou de baixa capacidade de uso (MACHADO et al., 2004; VIEIRA et al., 2006; SOARES et al., 2007a; ANJOS et al., 2009; BARROS et al., 2010).

### 1.1.4. Formas de propagação

A mangabeira tem grande potencial para exploração econômica, porém a falta de informações sobre essa cultura vem restringindo seu cultivo comercial, tornando o seu aproveitamento limitado a pequenos produtores e a exploração extrativista (COSTA et al., 2005; SOARES et al., 2007a; SOARES et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

Sua propagação pode ser via assexuada, mediante o uso de parte vegetal e sexuada, através da semente. Porém, estas têm curta longevidade, sendo necessário sua semeadura logo após a extração do fruto, além do seu mesocarpo ter uma ação inibitória sobre a germinação. Suas sementes são consideradas recalcitrantes, e a redução do seu

teor de água pode ocasionar danos, prejudicando sua viabilidade e vigor e, com isso, reduzir seu poder germinativo. Suas mudas apresentam crescimento lento, o que é comum em árvores do cerrado. Esta característica reduz o interesse em propagar a mangaba e outras árvores frutíferas (PINHEIRO et al., 2001; COSTA et al., 2005; SOARES et al., 2007b; SOARES et al., 2009; CALDAS et al., 2009; BARROS et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

## **1.2. Produção de mudas via cultura de tecidos**

A necessidade de um grande número de mudas de alta qualidade e baixo valor de produção, para instalação de pomares, requer o uso de métodos intensivos de propagação. A micropropagação é a alternativa mais utilizada para obtenção de um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano. Esta tem sido importante na propagação de diferentes espécies, que assim como a mangaba, têm baixa taxa de germinação. Embora o processo envolva diferentes etapas após definido um protocolo, seja qual for a espécie, podendo ser otimizado para obtenção de plantas com alta qualidade e baixo valor de produção (LÉDO et al., 2007; SOARES et al., 2007a; REIS et al., 2008).

A micropropagação compreende o cultivo asséptico de partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Tal técnica vem se tornando comum no mercado, visando suprir à demanda de uma fruticultura cada vez mais tecnificada e com alta capacidade de multiplicação em grande escala de mudas livres de patógenos. Dentre as vantagens, deve-se ressaltar a propagação rápida mediante a indução de múltiplos brotos, resultando em material propagativo com potencial de produção contínua. No entanto, o sucesso na aplicação desta técnica depende de uma série de fatores que precisam ser controlados adequadamente durante o processo (COSTA et al., 2007; CHAGAS et al., 2008).

### **1.2.1. Meios de cultivo**

Vários protocolos de micropropagação são testados para diversas espécies, no entanto, o sucesso depende de alguns fatores, sendo um deles o meio de cultivo a ser utilizado (REIS et al., 2008). O meio de cultivo fornece os nutrientes necessários para o crescimento *in vitro*. É composto de componentes essenciais e opcionais que visam

atender as exigências das plantas, que são variáveis com a espécie, cultivar ou explante utilizados, devendo ser experimentalmente definido para cada caso, em particular. Por isso, todos os nutrientes do meio de cultivo devem estar em concentrações otimizadas, de forma a assegurar o crescimento dos explantes (BASSAN et al., 2006; FICK et al., 2007).

A composição básica dos meios constitui de água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, mioinositol, podendo ainda conter regulador de crescimento, misturas complexas como água de coco e extratos vegetais e outros aditivos, como os antioxidantes, antibióticos e aminoácidos. Se o meio a ser preparado for sólido, acrescenta-se ágar (NUNES et al., 2008; STANCATO et al., 2008; PASQUAL et al., 2009).

As soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultivo não exercem efeito apenas nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (BRAUN et al., 2010).

Uma grande variedade de meios de cultivo tem sido utilizada para a regeneração de espécies de diferentes gêneros. Dentre eles, a formulação de Murashige & Skoog (1962) (MS) é a mais utilizada, principalmente em trabalhos de multiplicação de diversas espécies. Entretanto, tal meio não é satisfatório em alguns casos, quando as composições mais diluídas em macronutrientes têm melhor desempenho. Na sequência, tem-se o meio de Gamborg (B<sub>5</sub>) (GAMBORG et al., 1968) e o Woody Plant Medium (WPM), elaborado por Lloyd e Mccow (1980), que contém 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, sendo amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (VILLA et al., 2006; BASSAN et al., 2006; SOARES et al., 2009; JESUS et al., 2010; WERNER et al., 2010).

Outro fator a ser estudado é a influência do volume de meio de cultivo, sendo regra geral, que, quanto menor o explante, menor a quantidade de meio a ser utilizado. Porém, em culturas estabelecidas, a taxa de crescimento é diretamente proporcional à quantidade de meio (REIS et al., 2004). Já o pH influencia na disponibilidade de nutrientes, reguladores de crescimento e no nível de solidificação do ágar no meio de cultivo (HUDA et al., 2009). Se adequado promove maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Para um crescimento adequado da maioria das espécies, a faixa de 5,0 - 6,5 é a mais adequada, sendo que, se os níveis de pH forem inferiores a 4,5 e

superiores a 7,0, poderá ocorrer paralisação do crescimento e desenvolvimento *in vitro* (PASQUAL et al., 2002; BHATIA & ASHWATH, 2005).

### **1.2.2. Tipos de vedações**

O microambiente dentro dos frascos de cultivo parece ser homogêneo, mas é um dos responsáveis pela variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são os tipos de frascos, tampa e quantidade de meio (DONINI et al., 2011). O etileno induz a abscisão foliar e é um dos maiores problemas para o cultivo *in vitro*, em que o acúmulo de gases é promovido por alguns tipos de fechamentos utilizados nos recipientes, que não permitem trocas gasosas com o meio externo. O uso de diferentes sistemas de vedação, como os materiais mais porosos, tais como algodão ou filtros permeáveis a gases, favorecem as trocas gasosas (DAMIANI & SCHUCH, 2009; NEPOMUCENO et al., 2009).

### **1.2.3. Constituição do meio e condições de cultivo**

As características físicas do meio de cultivo também desempenham papel importante no sucesso do estabelecimento *in vitro* (MURASHIGE, 1977), há espécies cujos explantes desenvolvem melhor em meio líquido, outras em meio sólido e um terceiro grupo responde melhor em meio líquido com suporte.

Apesar do ágar ser muito utilizado pela sua eficiência como agente solidificante, o sistema de meio líquido torna mais interessante pela maior agilidade no seu preparo. Além disso, o maior contato dos explantes com o meio de cultivo pode aumentar a absorção de água e nutrientes, proporcionar uma maior assimilação dos nutrientes e, com isso, um crescimento mais vigoroso dos explantes, quando os meios líquidos são usados com sistemas de aeração. O cultivo em meio líquido com o sistema de aeração também possibilita a automação do processo de micropopagação, podendo ser utilizada em escala comercial (FARIA et al., 2006; SILVA et al., 2007; MENGARDA et al., 2009).

#### **1.2.4. Reguladores de crescimento**

No meio de cultivo, geralmente são adicionados reguladores de crescimento com o objetivo de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, estimulando respostas no crescimento, alongamento e multiplicação, dependendo do estado fisiológico dos explantes, que são influenciados pela época do ano e pelas condições gerais da planta matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Diferentes tipos de auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico são conhecidos por seus diversos efeitos no crescimento e no metabolismo secundário (SAKUTA & KOMAMINE, 1987; VILLA et al., 2006; STEFANELLO et al., 2009).

Dependendo da espécie cultivada, ocorre uma resposta a presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo, para a classe, tipo e concentrações utilizadas. A relação entre auxinas e citocininas é essencial para alcançar os melhores resultados na micropropagação, porque a interação entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese na cultura de tecidos e órgãos (SOARES et al., 2007; PINHAL et al., 2011). As auxinas promovem o alongamento celular e ativação de enzimas hidrolíticas, porém, em altas concentrações podem prejudicar o crescimento da plântula. As citocininas atuam na divisão celular e podem induzir a embriogênese somática (LACERDA et al., 2008; VILLA et al., 2008; REZENDE et al., 2009; WERNER et al., 2010).

#### **1.2.5. Enraizamento *in vitro***

Na fase de enraizamento para indução de raízes adventícias em espécies lenhosas, é comum a adição de auxinas exógenas no meio de cultivo, que são os únicos reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares, por exemplo, o ácido indolbutírico (AIB). O uso de reguladores de crescimento aumenta a velocidade de formação de raízes e a uniformidade do enraizamento, principalmente em plantas em que este processo é mais difícil de ocorrer (NASCIMENTO et al., 2008; KRATZ et al., 2011). Entretanto, quando a concentração de auxina no meio de cultivo é excessiva, ocorre formação de calos na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea (RADMANN et al., 2002; LEITZKE et al., 2009).

O enraizamento *in vitro* também é influenciado pelas modificações na constituição do meio de cultivo, em que a maioria das espécies forma raízes com adição

de 20-30g L<sup>-1</sup> de sacarose em virtude da baixa capacidade fotossintética das plantas cultivadas *in vitro*, essas requerem a adição de carboidratos para suprir suas necessidades metabólicas. O aumento da concentração de sacarose estimula o crescimento e a formação de raízes de algumas espécies *in vitro* na fase de multiplicação. A redução dessa concentração na fase de enraizamento beneficia a qualidade do sistema radicular, além de aumentar a taxa de sobrevivência das plântulas transplantadas (CALVETE et al., 2002; SKREBSKY et al., 2004).

A adição de carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% no meio de cultivo pode ser benéfica, por simular a condição de ausência de luminosidade, em que as raízes normalmente se desenvolvem. A redução da incidência de luz, na zona de crescimento ativo do sistema radicular, além de adsorver substâncias tóxicas, principalmente fenóis e/ou quinonas, pode afetar o desenvolvimento do explante (LÉDO et al., 2007).

## **1.2. Microrganismos promotores do crescimento de plântulas**

A maior parte do fósforo (P) dos solos brasileiros é encontrada sob formas pouco solúveis, tornando indisponível para a maioria das plantas (SILVA FILHO et al., 2002). Predominantemente, esses solos se encontram em avançado grau de intemperismo, sendo requeridas pesadas adubações fosfatadas para obter produtividade satisfatória das culturas. Além disso, cerca de 75% do P aplicado ao solo é perdido ou fica retido em suas partículas, o que contribui para seu acúmulo em formas não disponíveis nos solos cultivados (SOUCHIE et al., 2005; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; MOURA, 2008).

O fósforo (P) dos fertilizantes solúveis reage rapidamente com o solo, sendo convertido em formas que as plantas não absorvem. Na maioria dos solos ácidos, predominantes no cerrado brasileiro, a maior parte do P forma complexos com os óxidos de Fe e Al e, em solos alcalinos e neutros, encontra-se ligado ao Ca (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Alguns microrganismos edáficos são capazes, por meio de mecanismos diversos, de extrair ou solubilizar fósforo (P) de frações insolúveis no solo e de fosfatos inorgânicos naturais pouco solúveis, favorecendo a nutrição vegetal. Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) representam porcentagem significativa do total de microrganismos rizosféricos de várias espécies vegetais, desempenhando papel

importante no suprimento de P às plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; STEINER et al., 2009).

Apesar da predominância de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) no solo, geralmente os fungos solubilizadores de fosfato (FSF) possuem maior potencial de solubilização. A maioria é capaz de solubilizar fosfatos de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), mas poucos são capazes de solubilizar fosfatos de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ). A atuação no ciclo do P e sua influência na nutrição vegetal devem ser mais explorados, porque influenciam, desde as transformações de P no solo ou na rizosfera, até sua absorção e translocação na planta. O uso de fontes fosfatadas pouco solúveis, aliada à inoculação de MSF pode se tornar uma prática estratégica para amenizar custos com a adubação fosfatada (SIQUEIRA et al., 1999; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os MSF estão presentes em todos os solos, representando até 15% da população microbiana. A incidência de solubilizadores de fosfatos de cálcio é geralmente maior na rizosfera de leguminosas. Provavelmente, em decorrência do enriquecimento do solo com nitrogênio (N), favorecendo, portanto, o crescimento desses microrganismos, não há evidência de especificidade alguma desses com as plantas (SIQUEIRA et al., 1999; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A solubilização depende da linhagem do microrganismo, do tipo de fosfato a ser solubilizado, da acidez e da natureza dos materiais orgânicos produzidos, além do tipo de solo. A solubilização é relacionada à redução do pH e/ou à produção de ácidos orgânicos (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982; SOUCHIE et al., 2007; CERZINI et al., 2009; STEINER et al., 2009). O tipo de solo, a espécie e a idade das plantas afetam a população de solubilizadores (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982; NAHAS et al., 1994; SOUCHIE et al., 2006).

No solo, os MSF contribuem para aumentar a concentração de P na solução, que pode ser absorvido diretamente pelas raízes ou por hifas fúngicas em simbiose com as plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A inoculação de MSF aliada ou não, a outros microrganismos benéficos do solo, pode incrementar o desenvolvimento vegetal (SILVA FILHO & VIDOR, 2001; NARLOCH et al., 2002).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) constituem um grupo muito amplo de microrganismos, uma vez que, sob tal designação, incluem quaisquer bactérias da rizosfera que incrementam o crescimento de uma ou mais espécies vegetais. A liberação de exsudados pelas raízes, cria uma zona rizosférica rica em energia, favorecendo os microrganismos presentes, além de disponibilizar os

nutrientes para imediata absorção pelas raízes. Outros mecanismos de ação das RPCP são aventados pela maioria dos pesquisadores, como a produção de fitormônios, o controle biológico de fitopatógenos, a fixação assimbiótica ou a interferência na fixação simbiótica de nitrogênio (N) e a solubilização de fosfatos (MELO & AZEVEDO, 1998; FREITAS & VILDOSO, 2004; SILVEIRA & FREITAS, 2007; ARAUJO, 2008).

Diversas bactérias são reconhecidamente solubilizadoras de fosfatos, como espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* (fosfobacterinas), sendo empregadas como inoculantes para aumentar a disponibilidade de P às plantas, por meio da mineralização de fosfatos orgânicos, via ação das fosfatases ou por meio da solubilização de fosfatos inorgânicos, via liberação de ácidos orgânicos. Entre os fungos, destacam-se isolados de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e várias outras espécies desse gênero e de *Penicillium* (MELO & AZEVEDO, 1998; SIQUEIRA et al., 1999; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; KOLLN et al., 2009).

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVES, L.; SILVA FILHO, G. N. Produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.) em presença de diferentes fontes fosfatadas e microrganismos solubilizadores de fosfatos. **Semina**, v. 30, n. 3, p. 557-562, 2009.

ANJOS, J. R. N. dos; CHARCAR, M. J. D' A.; LEITE, R. G.; SILVA, M. S. Levantamento e patogenicidade de fungos associados às sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) no cerrado do Brasil central. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 911-915, 2009.

ARAUJO, F. F. de. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.

BARROS, D. I.; BRUNO, R. de L. A.; NUNES, H. V.; SILVA, G. C. da; PEREIRA, W. E.; MENDONÇA, R. M. N. Métodos de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 25-27, 2006.

BARROS, D. I.; BRUNO, R de L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação. **Revista Acta Tecnológica**, v. 5, n.01, p. 31-43, 2010.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.

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

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de Canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BHATIA, P.; ASHWATH, N. Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotylenodary explants of tomato. **Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 7-10, 2005.

BRAUN, H.; LOPES, J. C.; SOUZA, L. T. de; SCHMILDT, E. R.; CAVATTE, R. P. Q.; CAVATTE, P. C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina**, v. 31, n. 3, p. 539-546, 2010.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. IN: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 37-70.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.

CAMOLESI, M. R.; FARIA, R. T. de; NEVES, C. S. V. J.; MARTINS, A. N. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 255-260, 2010.

CEREZINI, P.; MILANI, K. M. L.; BALOTA, E. L. Seleção de microrganismos solubilizadores de fosfato. **Synergismus scyentifica**, v. 4, n. 1, p. 1-3, 2009.

CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; NALON, F. H. Produção de mudas de hortelã-japonesa em função da idade e de diferentes tipos de estaca. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2157-2163, 2008.

COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.

COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de; PEREIRA, J. E. S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 1, p. 41-46, 2007.

COSTA, G. M. da; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. de. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1012-1017, 2009.

DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira 'Arbequina'. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, 2011.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF-kB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1064-1069, 2009.

FARIA, R. T. de; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. da. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 14, p. 473-478, 2007.

FESTER, T.; MAIER, W.; STRACK, D. Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and coinoculation with rhizosphere bacteria. **Mycorrhiza**, v. 8, p. 241-246, 1999.

FICK, T. A.; BISOGNIN, D. A.; QUADROS, K. M. de; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. S. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de Louro-pardo. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1990. p. 183-260.

HUDA, K. M. K.; BHUIYAN, M. S. R.; ZEBA, N.; BANU, S. A.; MAHMUD, F.; KHATUN, A. Effect of FeSO<sub>4</sub> and pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of Tossa Jute. **Plant Omics Journal**, v. 2, n. 5, p. 190-196, 2009.

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P. de; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, v. 11, n.6, p. 431-436, 2010.

KOLLN, O. T.; SHIOMI, H. F.; KAWAKAMI, J.; MICHALOVICK, L.; MULLER, M. M. L. Efeito de isolados de bactérias e pó de basalto no crescimento inicial de plantas de milho cultivadas em vaso. **Synergismus scyentifica**, v. 4, n. 1, 2009.

KRATZ, D.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; Concentrações de ácido indolbutírico no enraizamento de *Cryptomeria japonica*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 14-21, 2011.

LACERDA, G. A.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; PAIVA, L. V.; MELO, E. F.; OLIVEIRA, A. C. S. de; REZENDE, J. C. de. Influência de reguladores de crescimento no desenvolvimento radicular de sementes de *Coffea arábica* L. "Rubi" *in vitro*. **Coffee Science**, v. 3, n. 1, p. 81-84, 2008.

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

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

MACHADO, L. de L.; RAMOS, M. L. G.; CALDAS, L. S.; VIVALDI, L. J. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 431-435, 2004.

MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 530-537, 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.

MENGARDA, L. H. G.; POVOAS, L.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 6, p. 469-474, 2009.

MOURA, J. B. de. **Adsorção de fósforo em Latossolo Vermelho distrófico sob vegetação de Cerrado e uso de fino de carvão vegetal**. 2008. 30 f. Monografia de Graduação - Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde-GO.

MORAES, A. M. de; ALMEIDA, F. de A. C.; BRUNO, R. de L. A.; CAZÉ FILHO, J.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 932-936, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras. Editora UFLA, 2006. 729 p.

MURASHIGE, T. Clonal crops through tissue culture. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENCK, M. H. (Eds.). **Plant tissue culture and its biotechnological application**. New York: Springer-Verlag, p. 392-406, 1977.

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

NAHAS, E.; FORNASIERI, D. J.; ASSIS, L.C. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 463-469, 1994.

NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V. L. de; ANJOS, J. T. dos; SILVA FILHO, G. Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p.841-845, 2002.

NASCIMENTO, A. da C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2008.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. de S.; QUEIROZ, S. R. de O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. de. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anandananthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v. 33, n. 03, p. 481-490, 2009.

NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N. dos; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. G. de. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.

PASQUAL, M; FIGUEIREDO, M. A.; REZENDE, J. C.; ARAÚJO, A. G.; SANTOS, F. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, K. P. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 211-216, 2009.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. de O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira “Poncã” em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002.

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

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.

PINTO, J.E.B.P. **Fatores que afetam o crescimento e a morfogênese**, Lavras: UFLA, 1998. 6p. (Apostila).

PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. **Introdução a Cultura de Tecidos**, Lavras: ESAL. 1990. 73p. (Apostila).

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos da macieira ‘M-9’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; CORRÊA, R. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, O. A. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na

multiplicação de Ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 703-709, 2004.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008.

REZENDE, J. C. de; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; SANTOS, F. C. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* sp.: adição de reguladores de crescimento e sacarose. **Agrarian**, v. 2, n. 3, p. 99-114, 2009.

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

SAKUTA, M; KOMAMINE, A. Cell growth and acumulation of secondary. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K.(eds.), **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell culture in phytochemistry**.San Diego: Academic Press, 1987. V. 4, Cap.5, p. 97-114.

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, p. 606-610, 2006.

SANTOS, A. F. dos; SILVA, S. de M.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E. Conservação pós-colheita de mangaba em função da maturação, atmosfera e temperatura de armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 85-91, 2009.

SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras-MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Ciência do Solo. 1999. 818 p.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

SILVA, D.B., SILVA, J.A., JUNQUEIRA, N.T.V., ANDRADE, L.R.M. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 178 p. 2001.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p.1495-1508, 2001.

SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S.; **Microbiota do solo e Qualidade ambiental**. Instituto Agronômico, Campinas-SP, 312 p., 2007.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.

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

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; CAMPOS, A. C. A. L.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C. Germinação de sementes de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1180-1182, 2007b.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. de S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. da. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUCHIE, E. L.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.; CAMPELLO, E. F. C.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ - Brazil. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p.183-193, 2006.

STANCATO, G. C.; ABREU, M.F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epifíticas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, v. 67, n. 1, p. 51-57, 2008.

STEFANELLO, S.; KARSTEN, J.; MÜLLER, T. S.; TOMEZAK, A. P.; BONETT, L. P.; SCHUELTER, A. R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 53-59, 2009.

STEINER, F.; LANA, M. do C.; FRANDOLOSO, J. F.; FEY, R.; ZOZ, T. Fosfato de Gafsa e fungos solubilizadores de fosfato e seus efeitos na cultura do trigo. **Cultivando o Saber**, v. 2, n. 1, p. 156-164, 2009.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p.15-22, 1982.

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 320 p.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G. S.; MIYATA, L. Y. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'Cherokee': efeito de meios de cultura, cinetina e GA3. **Ceres**, v. 53, n. 307, p. 357-362, 2006.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A. de; PIO, L. A. S.; ASSIS, G. A. de. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1754-1759, 2008.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Desenvolver um protocolo para propagação *in vitro* de mangabeira.

Avaliar o crescimento de mangabeira *in vitro* inoculada com bactérias e fungos solubilizadores de fosfato e produtores de fitormônios, para maximizar a produção de mudas para reflorestamento e formação de pomares.

## CAPÍTULO I

### CRESCIMENTO IN VITRO DE EXPLANTES DE MANGABEIRA VARIANDO CONCENTRAÇÕES DE SAIS E VOLUMES DE MEIOS DE CULTIVO

#### RESUMO

Em trabalhos de micropropagação envolvendo uma espécie vegetal pouco estudada, um fator a ser investigado é o meio de cultivo a ser utilizado, conciliando a concentração dos sais e o volume. A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie arbórea nativa do cerrado, que se destaca como planta frutífera e produtora de látex para a indústria de borracha, sendo que sua exploração ainda predomina o extrativismo. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito de diferentes meios de cultivo, concentrações de sais e volumes no crescimento *in vitro* de segmentos nodais de *H. speciosa* Gomes. No ensaio I, testaram dois meios de cultivo (MS e WPM) e diferentes concentrações de sais (25, 50 e 100%). Já no ensaio II, testaram dois meios de cultivo (MS e WPM) em diferentes volumes (10, 15, 20, 25 e 30 mL). Em ambos os ensaios utilizaram delineamento inteiramente ao acaso, em que cada repetição era contida por um tubo de ensaio. Aos 30 e 60 dias de cultivo avaliaram: comprimento médio das plântulas, número médio de folhas expandidas, gemas e senescência. O número de raízes adventícias foi avaliado apenas no ensaio I. Conclui-se que o meio WPM, na concentração de sais a 50% promove um maior crescimento *in vitro* de plântulas de mangaba. O volume de 20 mL foi o mais adequado por propiciar menor abscisão foliar.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa* Gomes, cerrado, abscisão foliar.

## CHAPTER 1

### **IN VITRO GROWTH OF MANGABEIRA EXPLANTS RANGING SALT CONCENTRATIONS AND VOLUMES OF MEDIA CULTURE**

#### ABSTRACT

In studies of micropropagation involving a poorly studied plant species, a factor to be investigated is the culture medium to be used, combining the volume and salts concentration. Mangabeira (*Hancornia speciosa*) is a cerrado native tree, which stands out as a fruit plant and latex producer for rubber industry and for its exploitation still prevails the extraction. The objective of this study was to evaluate the effect of different culture media, salt concentrations and volumes in the *in vitro* growth of nodal segments of *H. speciosa* Gomes. In the essay I were tested two different culture media (MS and WPM) and different salt concentrations (25, 50 and 100%). In the test II, were evaluated two culture medium (WPM and MS) at different volumes (10, 15, 20, 25 and 30 ml). In both assays it was used a completely randomized design, which each repetition consisted of a test tube. At 30 and 60 days after inoculation rate were evaluated: the average length of the seedlings, the average number of expanded leaves, buds and senescence. The number of adventitious roots was evaluated only in the assay I. It was concluded that the WPM, in the salt concentration at 50% promotes a higher *in vitro* growth of mangaba seedlings. The volume of 20 mL was the most suitable for providing lower leaf abscission.

**Key words:** *Hancornia speciosa* Gomes, cerrado, leaf abscission

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as árvores frutíferas nativas do cerrado, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca como uma das mais promissoras para os programas de exploração sustentável. Seu fruto é apreciado pelas suas características físicas, aroma e sabor, além de ser uma fonte rica em proteína (1,3 a 3,0%) (PINHEIRO et al., 2001; CALDAS et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

A mangabeira contém uma polpa branca, agridoce e aromática, sendo 80% da polpa aproveitada na forma de sucos, sorvetes, licores, doces, vinho e vinagre ou consumida *in natura* (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2009). Os frutos são do tipo baga, de tamanho, formato e cores variados, normalmente arredondados, amarelados ou esverdeados, com pigmentação vermelha ou sem pigmentação. Por ser uma planta laticífera, a presença do látex nos frutos é uma vantagem para a preparação de sorvetes e geleias (SILVA et al., 2001; SAMPAIO & NOGUEIRA, 2006; SOARES et al., 2007a)

Na medicina tradicional, o látex obtido do tronco da mangabeira é usado para proteger contra doenças gástricas e tuberculose, além de ser usado para estimular a função hepática, e tratar acne, verrugas, hipertensão e certos tipos de inflamações (SAMPALIO & NOGUEIRA, 2006; ENDRINGER et al., 2009; MARINHO et al., 2011). Seu látex tem potencial de uso industrial, as características físico-mecânicas conferem ao látex da mangabeira boas características tecnológicas, podendo ser usado em aplicações comerciais (VIEIRA et al., 2006; SOARES et al., 2007a).

A falta de informações sobre essa cultura vem restringindo seu cultivo comercial, tornando o seu aproveitamento limitado a pequenos produtores e a exploração extrativista (COSTA et al., 2005). Sua propagação é feita via sexuada, sendo dificultada pelo elevado grau de recalcitrância de suas sementes, além do seu mesocarpo ter uma ação inibitória sobre a germinação. Suas mudas têm um crescimento lento, o que é comum em árvores do cerrado. Esta característica reduz o interesse em propagar a mangaba e outras árvores frutíferas (SOARES et al., 2007b; CALDAS et al., 2009; SOARES et al., 2009).

A necessidade de um grande número de mudas de alta qualidade e baixo valor de produção, para instalação de pomares requer o uso de métodos intensivos de propagação. A micropropagação utilizando técnicas de cultura de tecidos é a alternativa mais utilizada com a finalidade de obter um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano, sendo importante na propagação de diferentes espécies,

que assim como a mangabeira tem baixa taxa de germinação (LÉDO et al., 2007; SOARES et al., 2007a).

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies, no entanto, o sucesso depende de alguns fatores, sendo, um deles, o meio de cultivo a ser utilizado (REIS et al., 2008). O meio de cultivo visa atender as necessidades da espécie trabalhada e fornece os nutrientes necessários para o crescimento *in vitro*. Ele é composto de componentes essenciais e opcionais que visam atender as exigências das plantas, que são variáveis com a espécie, cultivar ou explante utilizados, devendo ser experimentalmente definido para cada caso em particular. Por isso, todos os nutrientes do meio de cultivo devem estar em concentrações otimizadas de forma a assegurar o crescimento dos explantes (BASSAN et al., 2006; FICK et al., 2007).

Uma grande variedade de meios de cultivo tem sido utilizada para a regeneração de espécies de diferentes gêneros. Dentre eles a formulação de Murashige e Skoog (1962) (MS) é a mais utilizada principalmente em trabalhos de multiplicação de diversas espécies. Entretanto este não é satisfatório em alguns casos e composições mais diluídas em macronutrientes tem melhor desempenho. Em seguida vem o meio de Gamborg (B<sub>5</sub>) (GAMBORG et al., 1968) e o Woody Plant Medium (WPM) elaborado por Lloyd e Mccow (1980), que contém 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, sendo amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas para a propagação destas (BASSAN et al., 2006; VILLA et al., 2006; SOARES et al., 2009; JESUS et al., 2010; WERNER et al., 2010).

Outro fator a ser estudado é a influência do volume de meio de cultivo, sendo regra geral, que quanto menor o explante, menor a quantidade de meio a ser utilizado, porém em culturas estabelecidas, a taxa de crescimento é diretamente proporcional à quantidade de meio (REIS et al., 2004).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito de diferentes meios de cultivo, concentrações de sais e volumes no crescimento *in vitro* de segmentos nodais de *H. speciosa* Gomes.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1. Estabelecimento *in vitro* de sementes de mangabeira

O material vegetal utilizado na propagação *in vitro* foi retirado de frutos de diferentes plantas de mangabeira coletados em cinco plantas, em setembro de 2010 na Fazenda Gameleira, localizada no município de Montes Claros de Goiás – GO (16° 06' 20'' S – 51° 17' 11'' W) a 592 m de altitude. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IF Goiano - Campus Rio Verde, GO.

A despolpa dos frutos foi realizada manualmente, com auxílio de peneira de alumínio malha nº55. Posteriormente, as sementes foram lavadas sob água corrente, para retirar o excesso de mesocarpo aderido, e imersas em recipiente com água corrente contendo três gotas de Tween - 80 durante 30 minutos. Em seguida, foram imersas por 30 segundos em álcool 70% (v/v) e 20 minutos em solução de cloro ativo (5%). O triplo enxágue foi feito em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada.

As sementes foram transferidas, uma a uma, para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20mL de meio de cultivo. O meio de cultivo utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado para a metade da concentração original dos sais (MS-50%), mais as vitaminas propostas por White (1943), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica®). O pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem. Após inoculação, as sementes foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25±3°C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, permanecendo para fornecer explantes preestabelecidos *in vitro*, para implantação dos ensaios.

## 2.2. Ensaio I – Crescimento *in vitro* de mangabeira em diferentes meios de cultivo e concentrações de sais

Segmentos nodais provenientes de plântulas *in vitro*, com 2 cm de comprimento e contendo duas gemas axilares, foram excisados e transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 20 mL de meio de cultivo.

Os meios de cultivo utilizados foram MS e o WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), que diferenciavam na concentração de sais (100, 50 e 25%), mais as vitaminas propostas por White (1943). No preparo dos meios utilizando 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica®). O pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem. Os

tubos inoculados foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de  $25\pm 3$  °C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de  $45-55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Após avaliação dos 30 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura, idêntico ao realizado no 1º subcultivo, e conduzidos nas mesmas condições experimentais até a avaliação aos 60 dias. Aos 30 e 60 dias, avaliaram o comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram), número de gemas, folhas expandidas, abscisão foliar e raízes adventícias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial  $2 \times 3$  (meio de cultivo x concentração dos sais) e cada tratamento continha 30 repetições, constituída por um tubo de ensaio, totalizando 180 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

### **2.3. Ensaio II – Crescimento in vitro de mangabeira em diferentes volumes de meio de cultivo**

Utilizou-se como fonte de explantes segmentos nodais, provenientes de plântulas preestabelecidas *in vitro* com 2 cm de comprimento e contendo duas gemas axilares, foram excisados e transferidos para tubos de ensaio (25 x 150mm), contendo os meios de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) ou o WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), que diferenciavam quanto ao volume de meio por tubo de ensaio (10, 15, 20, 25 e 30 mL). No preparo dos meios, utilizaram  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar (Dinâmica®). O pH foi ajustado para  $5,7\pm 0,3$  antes da autoclavagem. Após a inoculação os tubos de ensaio foram mantidos nas mesmas condições de crescimento que as descritas no ensaio I.

Após avaliação aos 30 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico ao realizado no 1º subcultivo, e conduzidos nas mesmas condições experimentais até a avaliação aos 60 dias. Aos 30 e 60 dias, avaliaram o comprimento médio da parte aérea, número de gemas, folhas expandidas e abscisão.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial  $2 \times 5$  (meio de cultivo x volume de meio por tubo de ensaio) e cada tratamento continha 20 repetições, constituído por um tubo de ensaio, totalizando 200 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância

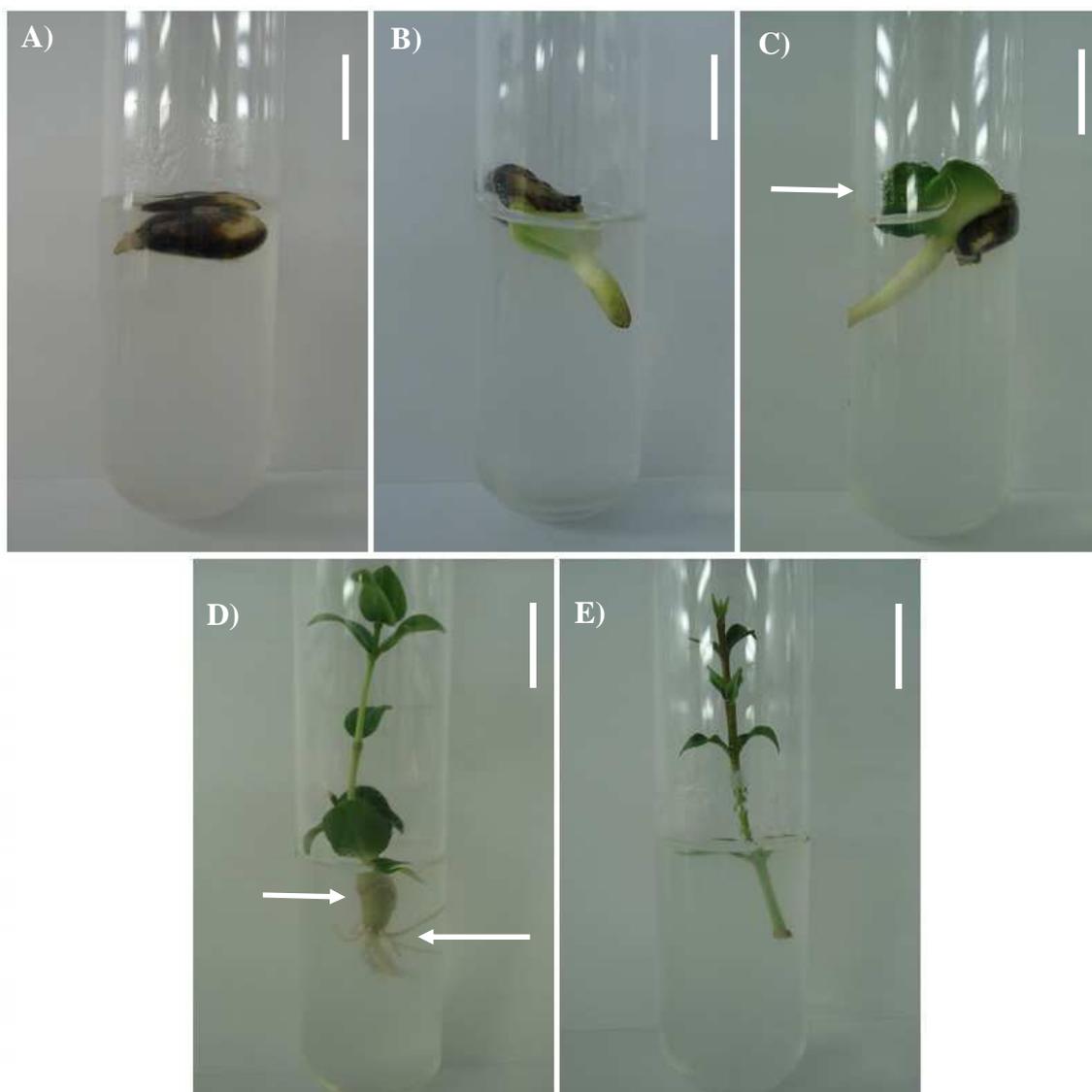
com aplicação do teste F (5%) e as médias analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2003).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Estabelecimento *in vitro* de sementes de mangabeira**

O início da germinação foi observado entre 10 e 15 dias após a transferência com as primeiras emissões da radícula. Com cerca de 20 dias ocorreu a emissão dos cotilédones foliares e aos 25 dias a emergência do epicótilo (Figura 1A, 1B e 1C). Esse tinha coloração roxo-avermelhado, assim como os nós cotiledonares e o primeiro par de folhas, que é característico da espécie, sendo que a mesma observação foi descrita por Lédo et al. (2007).

As plântulas originadas a partir das sementes eram bem formadas, vigorosas, com coloração verde-escura bem acentuada, características da espécie, com formação de raízes adventícias (Figura 1E e 1F).



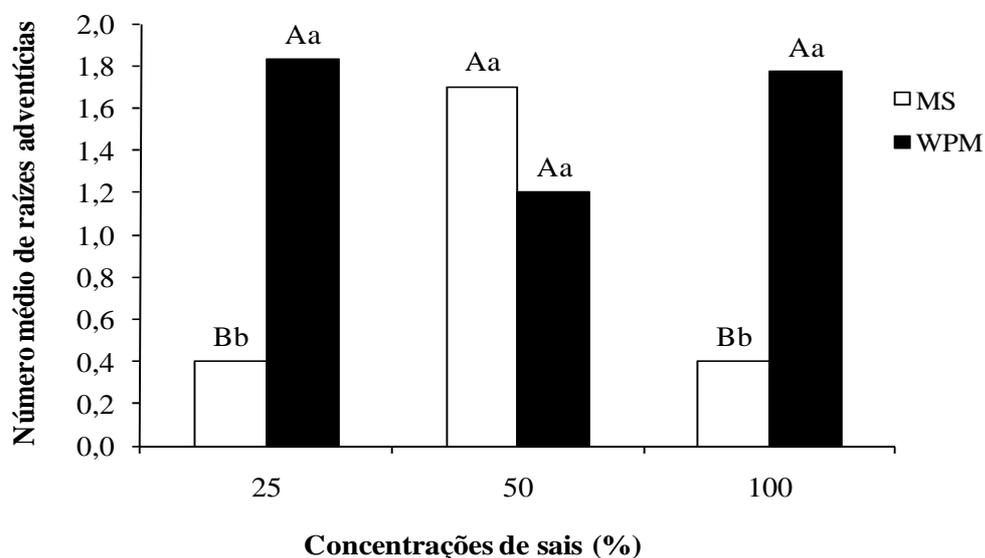
**Figura 1.** Início da emergência dos cotilédones em sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) (A); Cotilédones foliares (B); Plântula com cotilédones foliares e presença de raízes adventícias (C); Explante com 90 dias de cultivo *in vitro* (D). Cotilédones foliares, proeminência no hipocótilo e raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra= 10mm.

### 3.2. Ensaio I – Crescimento *in vitro* de mangabeira em diferentes meios de cultivo e concentrações de sais

Os diferentes tipos de meio de cultivo e concentração de sais avaliados não exerceram influência para abscisão, número médio de folhas expandidas, gemas e comprimento médio de parte aérea aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

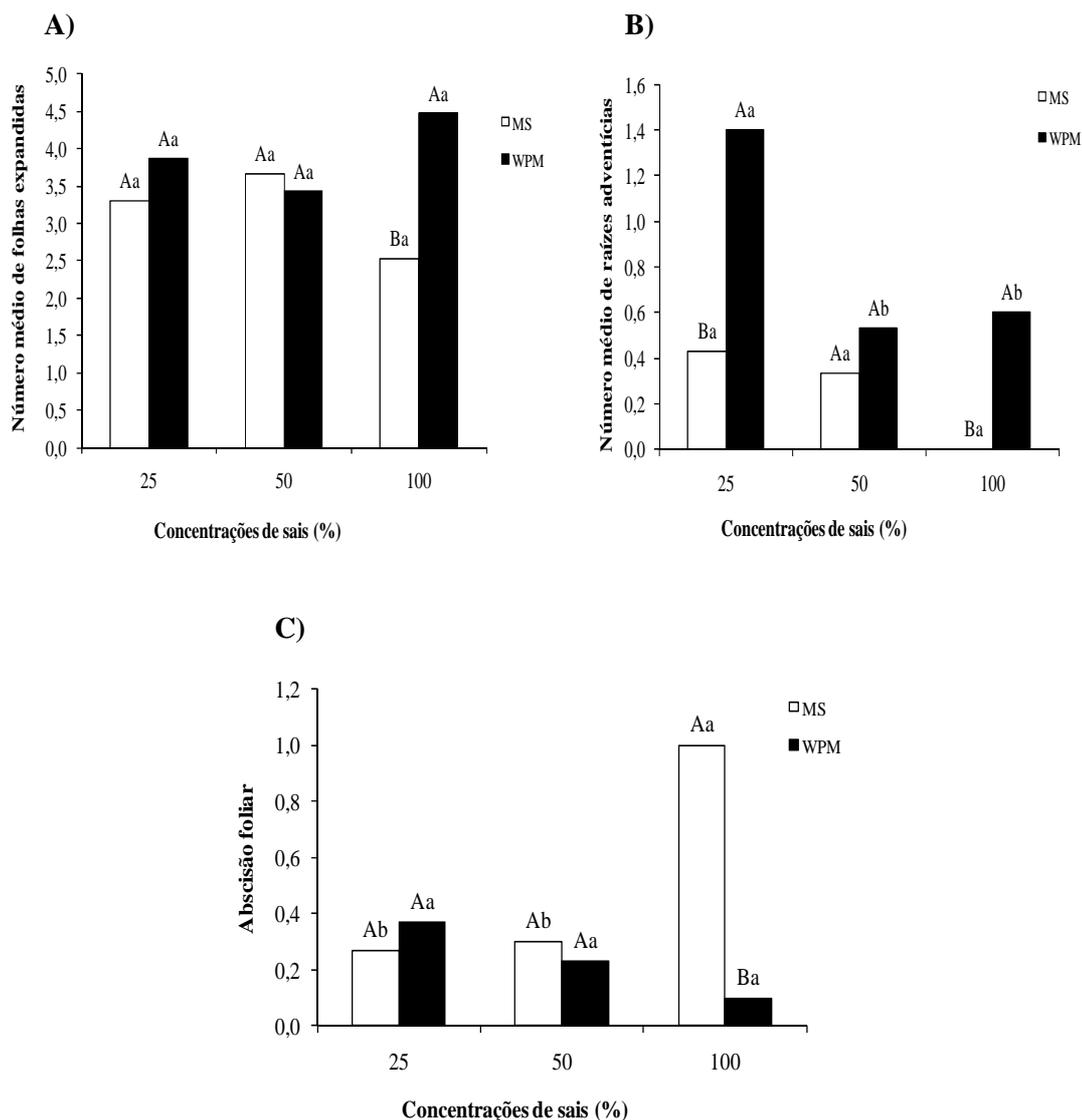
De acordo com a análise de variância aos 30 dias de cultivo, o meio de cultivo WPM propiciou plântulas com maior número médio de raízes adventícias (1,60), independente da concentração de sais. Quando as plântulas foram cultivadas em meio

MS na concentração de sais de 50%, o número médio de raízes adventícias foi ainda maior (1,70) (Figura 2).



**Figura 2.** Número médio de raízes adventícias em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 30 dias, cultivadas em diferentes meios de cultivo (MS e WPM) e concentrações de sais. Rio Verde - GO, 2012. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre os tipos de meio de cultivo e minúscula entre as concentrações dos sais, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

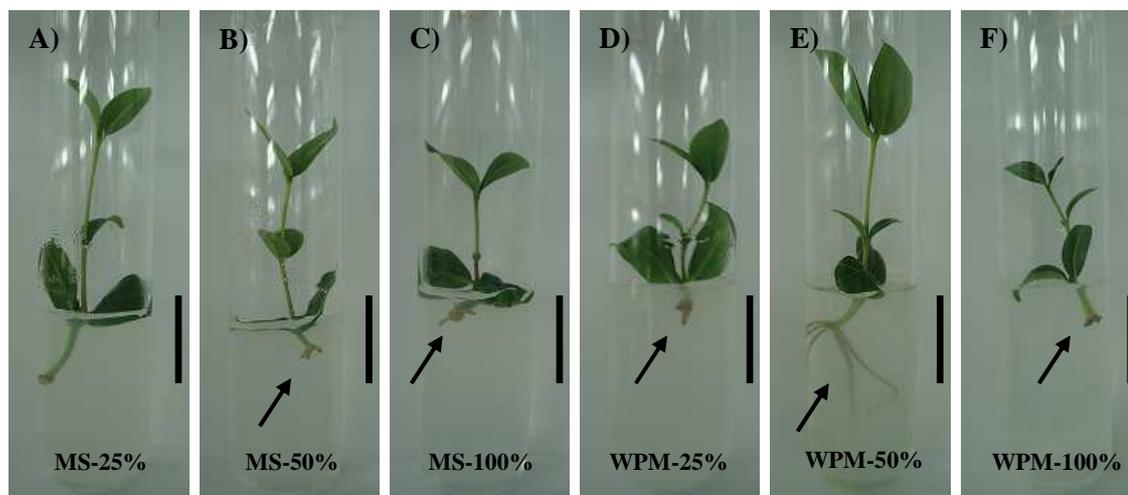
Aos 60 dias de cultivo maior número de raízes adventícias e folhas expandidas ocorreram em plântulas cultivadas em meio WPM, com os valores médios de 0,84 e 3,92, respectivamente. O maior número de raízes (1,40) ocorreu na concentração de 25% de sais, porém, as concentrações de sais não exerceram influência no número médio de folhas expandidas (Figura 3A e 3B). Maior abscisão foliar foi constatada em plantas cultivadas em meio MS com 100% das concentrações de sais aos 60 dias (Figura 3C).



**Figura 3.** Número médio de folhas expandidas (A), de raízes adventícias (B) e abscisão foliar (C), em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias cultivo *in vitro*, cultivadas em diferentes meios de cultivo (MS e WPM) e concentrações de sais. Rio Verde - GO, 2012. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre os tipos de meio de cultivo e minúscula entre as concentrações dos sais, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Nas observações visuais, constataram que os segmentos nodais em ambos os meios de cultivo e concentrações dos sais testados, aos 30 e 60 dias, regeneraram plântulas normais. Foi observada visualmente baixa contaminação bacteriana (8,67%) e nenhuma fúngica. Aos 30 dias de cultivo, as plântulas no meio MS exibiram uma coloração verde-escuras, com início de formação de raízes adventícias nas concentrações de sais de 50 e 100% (Figura 4A, 4B e 4C). As plântulas cultivadas em meio WPM tinham uma coloração verde-escura, com formação de raízes na

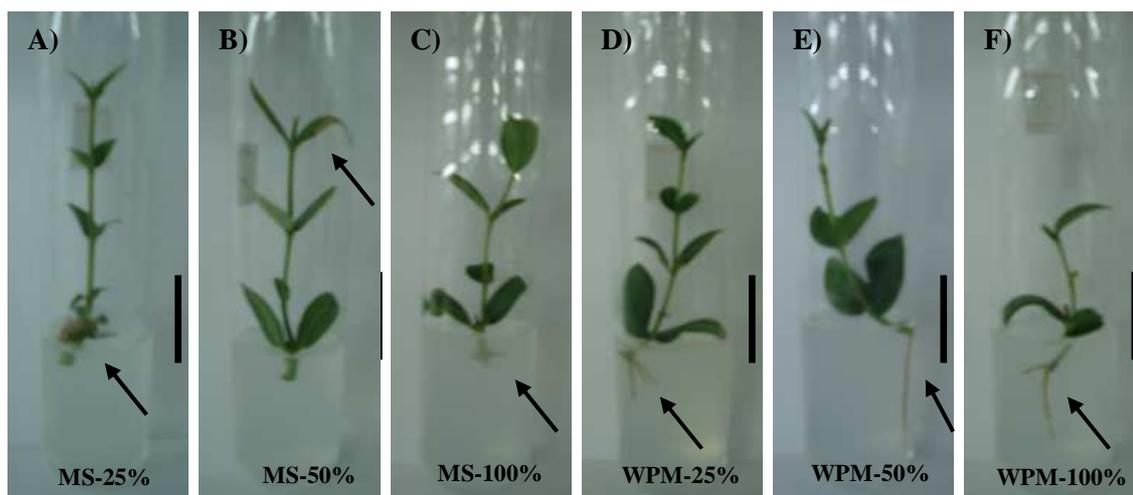
concentração de sais de 50%, e com início de formação nas outras concentrações de sais (Figura 4D, 4E e 4F).



**Figura 4.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sais nos meios de cultivo MS e WPM. MS-25% (A); MS-50% (B); MS-100% (C); WPM-25% (D); WPM-50% (E); WPM-100% (F). Raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

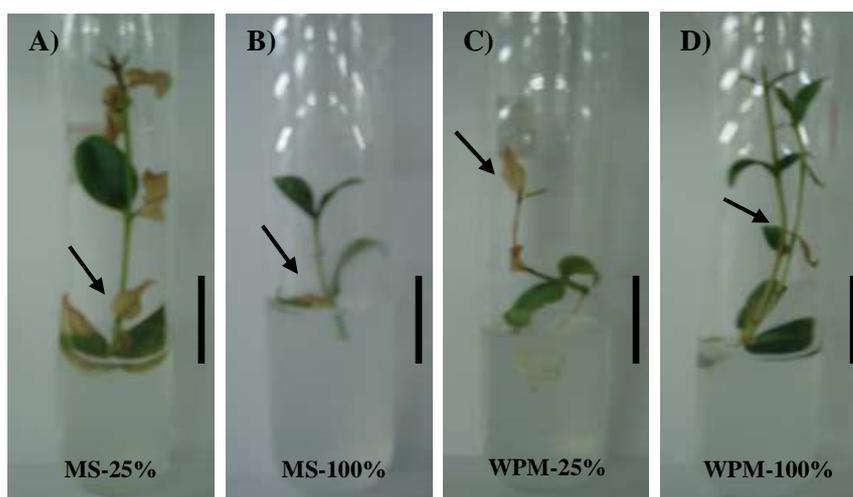
As plântulas cultivadas em meio MS, aos 60 dias, eram de coloração verde-escura. No meio de cultivo com concentração de sais de 25% as folhas obtidas eram rudimentares embora estivessem expandidas, se comparadas com os outros tratamentos, com coloração verde-escura. Ocorreu início de formação de calos na base da plântula (Figura 5A). Na concentração de sais de 50% foi observado alguns pontos amarelos nas folhas (Figura 5B). E na concentração de sais de 100% teve início de formação de raízes adventícias (Figura 5C).

No meio WPM, as plântulas obtidas eram de coloração verde-escura, porém a coloração verde-escura, das folhas expandidas da concentração de sais de 50%, era mais acentuada (Figura 5E). Houve formação de raízes adventícias em todas as concentrações de sais (Figura 5D, 5E e 5F).



**Figura 5.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sais nos meios de cultivo MS e WPM. MS-25% (A); MS-50% (B); MS-100% (C); WPM-25% (D); WPM-50% (E); WPM-100% (F). Início de formação de calos, pontos amarelos nas folhas, raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

Aos 60 dias, foram observadas folhas senescentes nas plântulas, em ambos os meios de cultivo, nas concentrações de sais de 25 e 100% (Figura 6). O comprimento médio da parte aérea e número médio de gemas por explante não foram influenciados pelos meios de cultivo e concentrações de sais



**Figura 6.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro*, com presença de folhas senescentes para os meios de cultivo MS e WPM, em duas concentrações de sais (25 e 100%). MS-25% (A); MS-100% (B); WPM-25% (C); WPM-100% (D). Folhas senescentes (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

Assim como verificado no presente trabalho, Disarz e Corder (2009) observaram uma maior multiplicação de gemas de acácia-negra [*Acacia mearnsii* (de Wild)] em meio de cultivo MS quando comparadas ao WPM. Já Unemoto et al. (2006), trabalhando com rainha-do-abismo (*Sinningia leucotricha* Hoehne) observaram que as maiores médias de altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, massa fresca total e número de brotações foram obtidas no meio de cultivo MS-50%.

No cultivo *in vitro*, empregando o meio WPM proporcionou ao açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), maior taxa de enraizamento (FLÔRES et al., 2011), e para aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) maior número de brotações (MELO et al., 1999). Donini et al. (2008), trabalhando com oliveira (*Olea europaea* L.), constataram maior número e comprimento de brotações e número de folhas, quando as plântulas foram cultivadas em meio WPM. Para plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica*) o meio WPM tem maior eficiência no crescimento *in vitro* das plântulas, quando comparado aos meios MS, Knudson e White (REZENDE et al., 2008). Para o estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) o meio WPM acrescido de zeatina proporcionou os melhores resultados, além de reduzir a taxa de oxidação das plântulas quando comparada com o meio de cultivo MS (SILVA et al., 2006). Segmentos nodais de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizzini) têm boa regeneração em meio de cultivo WPM 100 e 50% e MS 50 e 25% (ASSIS et al., 2012).

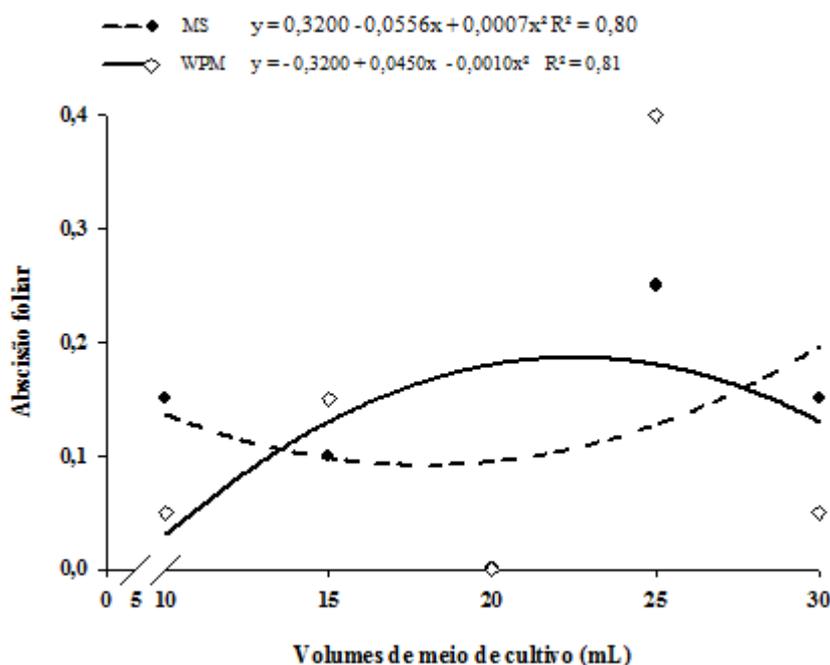
Contrário aos resultados obtidos neste trabalho, Léo et al. (2007) trabalhando com sementes de mangaba *in vitro*, observaram que no meio de cultivo MS-50% acrescido de 2,0 L<sup>-1</sup> de carvão ativado ocorreu o maior crescimento da raiz principal. Villa et al. (2005), trabalhando com amoreira-preta “Ébano” (*Rubus* sp.) relataram maior número de folhas em meio de cultivo MS-150%. Leitzke et al. (2010) constataram que tanto para amoreira-preta quanto para framboeseira, o meio de cultivo MS-100% proporcionou maior número médio de folhas, brotações e gemas quando comparado com o meio WPM.

Constatou-se desta forma, com os resultados obtidos que o meio de cultivo WPM foi o mais adequado para o crescimento *in vitro* de mangabeira, por proporcionar maior número de folhas expandidas e raízes adventícias. Ademais, por sua composição de sais ser relativamente reduzida o mesmo tem menor custo que o meio MS (FLÔRES et al., 2011). Em relação as concentrações de sais, a de 50% foi a mais adequada, porque apesar da concentração de 25% ter maior quantidade de formação de raízes

adventícias, plântulas que cresceram nessa concentração tiveram uma grande quantidade de folhas senescentes, sendo que o mesmo ocorreu na concentração de 100%.

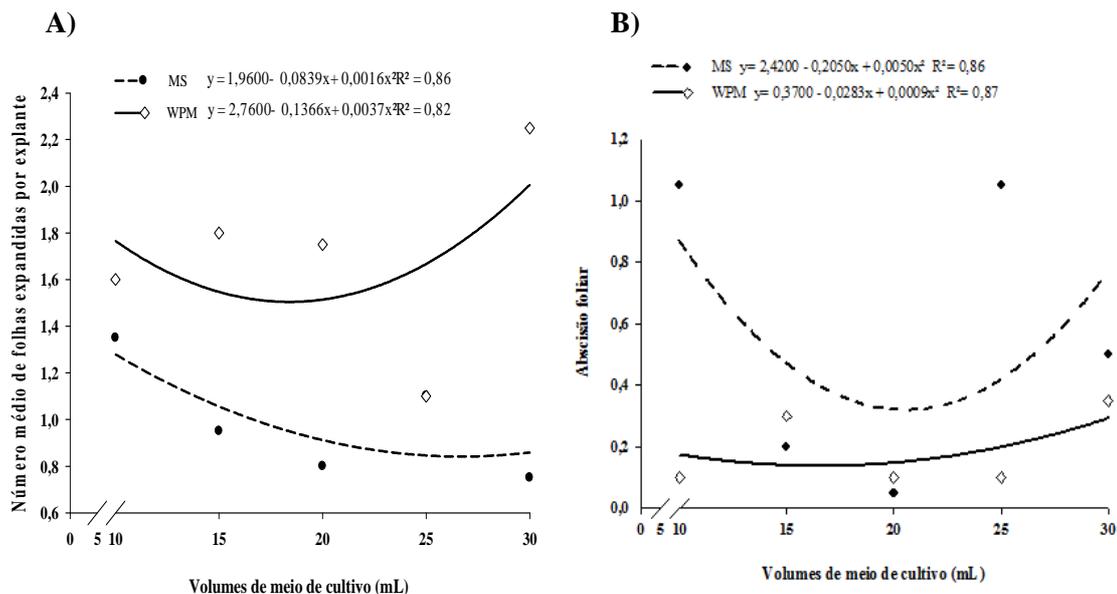
### 3.3. Ensaio II – Crescimento *in vitro* de mangabeira em diferentes volumes de meio de cultivo

Aos 30 dias, os meios de cultivo avaliados não exerceram influência na abscisão foliar. Por outro lado, à medida que o volume de meio aumentou, houve um aumento na abscisão *in vitro*, porém, quando foi utilizado 20 mL, não ocorreu abscisão foliar (Figura 7).



**Figura 7.** Abscisão foliar em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes volumes e meios de cultivo (MS e WPM). Rio Verde - GO, 2012.

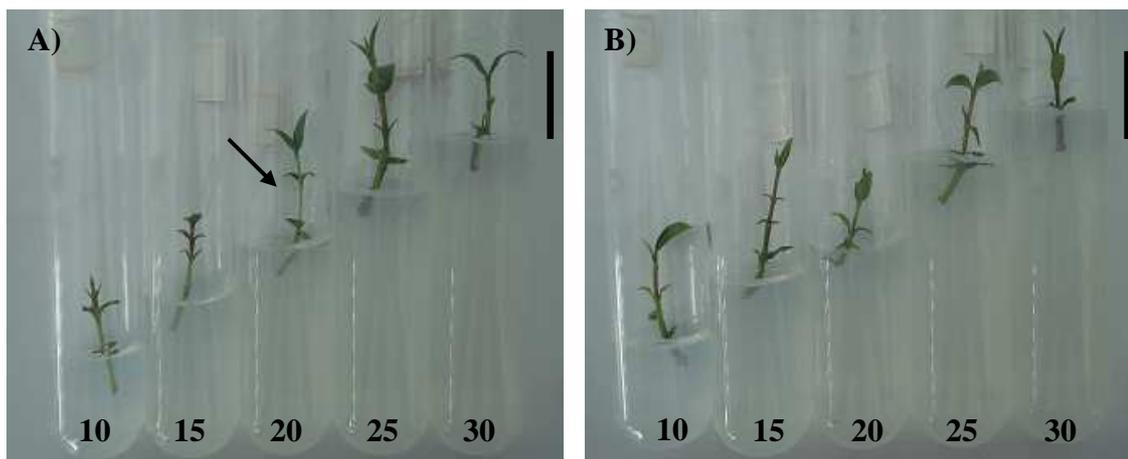
Os meios de cultivo e diferentes volumes não influenciaram o número médio de folhas expandidas, gemas e comprimento médio da parte aérea aos 30 dias, porém aos 60 dias, em meio WPM, foi constatado maior número médio de folhas expandidas. O volume de meio de cultivo não exerceu influência sobre o número de folhas expandidas (Figura 8A), porém, plântulas cultivadas em meio MS tiveram maior abscisão foliar (0,57), onde o volume de 20 mL induziu os menores valores médios (0,075) (Figura 8B).



**Figura 8.** Número médio de folhas expandidas (A) e abscisão foliar (B) em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes volumes e meios de cultivo (MS e WPM). Rio Verde - GO, 2012.

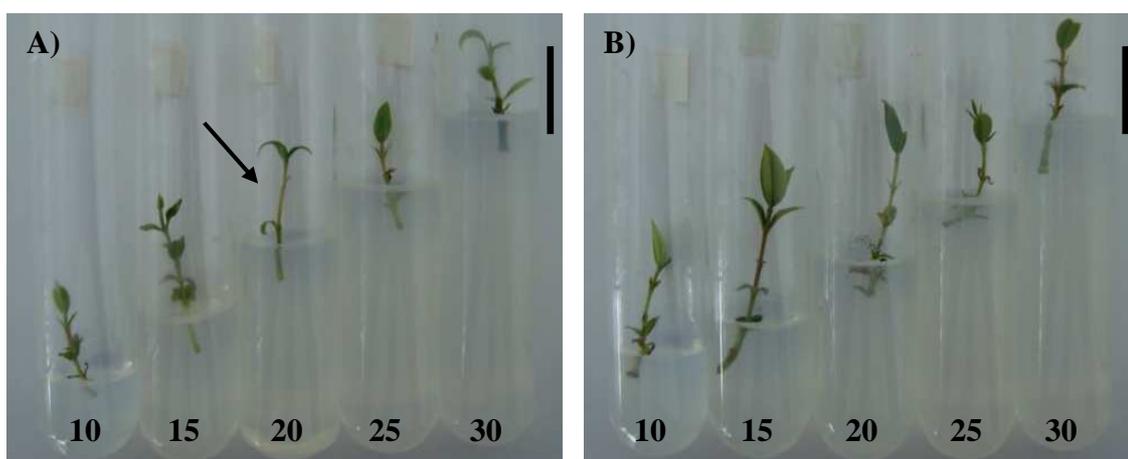
Os meios de cultivo avaliados não exerceram influência sobre o número médio de gemas e comprimento médio da parte aérea, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Em todos os tratamentos, houve regeneração dos segmentos em plântulas normais, bem formadas, sem alterações morfológicas ou oxidadas e ausência de formação de calos. Também foi notada baixa contaminação bacteriana (12,5%) e nenhuma fúngica.

Nas observações visuais, realizadas aos 30 dias, verificaram que as plântulas cultivadas no meio de cultivo MS eram bem formadas de coloração verde-clara. Dependendo do volume utilizado (20mL), algumas plântulas eram mais frágeis ao serem excisadas, por causa do aspecto estiolado. Não houve formação de raízes adventícias (Figura 9A). Já as plântulas cultivadas em meio de cultivo WPM eram vigorosas e rígidas ao serem excisadas, com coloração verde-escura e não houve formação de raízes adventícias (Figura 9B).



**Figura 9.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), submetidas a diferentes volumes (mL) e tipos de meio de cultivo (MS e WPM), após 30 dias de cultivo *in vitro*. Meio MS (A). Meio WPM (B). Plântula estiolada (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

Verificando que aos 60 dias, as plântulas cultivadas em meio MS mantiveram a coloração verde-clara, também observada aos 30 dias. Plântulas obtidas no volume de 20 mL, pelo aspecto estiolado, eram mais frágeis ao serem excisadas. As folhas obtidas no volume de 30 mL eram despigmentadas (verde-claras), quando comparadas com os outros volumes. Não houve formação de raízes adventícias (Figura 10A). No meio de cultivo WPM, as plântulas eram vigorosas e rígidas ao serem excisadas com coloração verde-escura, porém, as folhas do volume de 10 mL tinham coloração verde-clara. Não houve formação de raízes adventícias (Figura 10B).



**Figura 10.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), submetidas a diferentes volumes (mL) e tipos de meio de cultivo (MS e WPM), após 60 dias de cultivo *in vitro*. Meio MS (A). Meio WPM (B). Plântula estiolada (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

Alguns autores descrevem resultados semelhantes ao descrito neste trabalho. Assis et al. (2012), em seus estudos com caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizzini), observaram que o volume de 15 mL proporcionou maior crescimento *in vitro*. Já para plântulas *in vitro* de melissa (*Melissa officinalis* L.), à medida que se aumentou o volume de meio, ocorreu um aumento do número de nós e comprimento do maior broto (REIS et al., 2007). O mesmo resultado foi relatado para ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), em que foram encontrados para maior número de brotações os volumes de 30 e 40 mL (REIS et al., 2004).

Portanto, plântulas de mangaba com maior número de folhas expandidas e menor abscisão ocorreram quando cultivadas em meio de cultivo WPM, na quantidade de 20 mL por tubo.

#### 4. CONCLUSÃO

Meio de cultivo WPM, na concentração de sais, a 50% e volume de 20 mL de meio de cultivo por tubo de ensaio, propicia um maior crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, K. C. de; PEREIRA, F. D.; CABRAL, J. S. R.; SILVA, F. G.; SILVA, J. W.; SANTOS, S. C. dos. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 77-83, 2012.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de Canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

CALDAS, L. S.; MACHADO, L. de L.; CALDAS, S. C.; CAMPOS, M. L.; CALDAS, J. A.; PHARIS, R. P.; PEREIRA-NETTO, A. B. Growth-active gibberellins overcome the very slow shoot growth of *Hancornia speciosa*, an important fruit tree from the Brazilian “Cerrado”. **Trees**, v. 23, p. 1229-1235, 2009.

COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.

DISARZ, R.; CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnii* de Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, v. 33, n. 4, p. 599-606, 2009.

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. de F.; SOUZA, J. A. de; SOARES, G. C. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. "Arbequina" para início da micropropagação. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1769-1772, 2008.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF-kB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1064-1069, 2009.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - versão 4,3. DEX/UFLA - Lavras, MG, 2003.

FICK, T. A.; BISOGNIN, D. A.; QUADROS, K. M. de; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. S. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de Louro-pardo. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

FLÔRES, A. V.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; CUNHA, A. C. M. C. M. da; GOLLE, D. P.; BASSAN, J. S. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P. de; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 6, p. 431-436, 2010.

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

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia** v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 530-537, 2011.

MELO, N. F. de; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento *in vitro* da Aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.

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

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; CORRÊA, R. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, O. A. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de Ipeca (*Psychotria ipecacuanha*(Brot.) Stokes.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 703-709, 2004.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Tipos de explantes e volumes de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 3, n. 2, p. 83-88, 2007.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008.

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

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 606-610, 2006.

SANTOS, A F. dos; SILVA, S. de M.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E. Conservação pós-colheita de mangaba em função da maturação, atmosfera e temperatura de armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 85-91, 2009.

SILVA, D. B., SILVA, J. A., JUNQUEIRA, N. T. V., ANDRADE, L. R. M. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.178 p.

SILVA, L. C. da; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A. de; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

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

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; CAMPOS, A. C. A. L.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C. Germinação de sementes de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)

em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1180-1182, 2007b.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, Edição Especial, p. 1847-1852, 2009.

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 320 p.

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G. de; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta “Ébano” em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G. S.; MIYATA, L. Y. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta ‘Cherokee’: efeito de meios de cultura, cinetina e GA<sub>3</sub>. **Ceres**, v. 53, n. 307, p. 357-362, 2006.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T. de; MENEGUCE, B.; ASSIS, A. M. de. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore-(Gesneriaceae). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 28, n. 4, p. 503-506, 2006.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v. 7, p. 53-65, 1943.

## CAPÍTULO II

### OTIMIZAÇÃO DO pH e VEDAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MANGABEIRA

#### RESUMO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) pertence à família Apocynaceae, é uma frutífera que possui grande potencial para exploração econômica. A sua propagação é feita via sexuada, sendo dificultada pelo elevado grau de recalcitrância de suas sementes, sendo necessário ser semeada logo após a extração do fruto, além do seu mesocarpo ter uma ação inibitória sobre a germinação destas. Suas mudas têm um crescimento lento, que reduz o interesse em propagar a mangaba. Objetivou-se com esse trabalho, avaliar a influência de faixas de pH e tipos de vedações no crescimento *in vitro* de mangabeira. No ensaio I, testaram faixas de pH (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5), enquanto no ensaio II, testaram vedações (película de PVC, tampão de algodão e tampa plástica). Em ambos os ensaios utilizando delineamento inteiramente casualizado, em que cada repetição era constituída por um tubo de ensaio. Após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* avaliaram: comprimento médio das plântulas (cm), número de folhas expandidas, gemas, porcentagem de raízes adventícias, comprimento médio de raízes (cm) e o número médio de brotações laterais foi avaliado apenas no ensaio I. O ajuste de pH de 5,0 proporcionou maior crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira, enquanto o tampão de algodão promoveu maior comprimento médio de parte aérea e porcentagem de raízes adventícias.

**Palavras – chave:** *Hancornia speciosa* Gomes, disponibilidade de nutrientes, trocas gasosas.

## CHAPTER II

### OPTIMIZATION OF pH AND SEALING IN THE *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF MANGABEIRA

#### ABSTRACT

Mangabeira (*Hancornia speciosa*) belongs to the family Apocynaceae, is a fruit that has great potential for economic exploitation. Its spread is sexual, being hampered due to the high recalcitrance degree of their seeds, being necessary to sow immediately after fruit removal, and the mesocarp has an inhibitory effect on its germination. Their seedlings have slow growth, which reduces the interest in spreading the mangaba. The objective of this study was to evaluate the influence of pH ranges and types of seals in the *in vitro* growth of *H. speciosa*. In the essay I were tested pH ranges (3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5), while in II trial were tested seals (PVC film, cotton plug and plastic cover). In both assays were used a completely randomized design, where each repetition consisted of a test tube. After 30 and 60 days of *in vitro* culture were evaluated: average length of seedlings (cm), number of expanded leaves, buds, percentage of adventitious roots, average root length (cm) and average number of buds was evaluated only in the test I. The pH adjustment of 5.0 showed higher *in vitro* growth of *H. speciosa* seedlings, while the cotton plug promoted higher average length of shoots and percentage of adventitious roots.

**Key words:** *Hancornia speciosa*, nutrient availability, gas exchange

## 1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) pertence à família Apocynaceae é uma frutífera que possui grande potencial para exploração econômica, encontrada naturalmente no Brasil, cuja distribuição ocorre em áreas da caatinga, cerrado, mata atlântica e floresta amazônica. Seus frutos são muito apreciados, pelo ótimo aroma, sabor e digestibilidade, podendo ser consumidos *in natura* ou processados na forma de sorvete, pudim, geleia, vinho, vinagre, xarope e licor (ENDRINGER et al., 2009; BARROS et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Sua madeira é utilizada na carpintaria para confecção de caixas e para produção de carvão, e o látex produzido é utilizado para fins ornamentais e sua borracha pode ser usada em aplicações comerciais (VIEIRA et al., 2006; SOARES et al., 2007a; BARROS et al., 2010).

A propagação desta espécie arbórea é feita via sexuada, sendo dificultada pelo elevado grau de recalcitrância de suas sementes, sendo necessário semear logo após a extração do fruto, além do seu mesocarpo ter uma ação inibitória sobre a germinação destas. Suas mudas têm um crescimento lento, o que tem reduzido o interesse em propagar a mangaba (SOARES et al., 2007b; CALDAS et al., 2009; SOARES et al., 2009; BARROS et al., 2010).

A aplicação da técnica de micropropagação ainda é limitada para a maioria das espécies lenhosas com interesse econômico e que possuem problemas como contaminação, oxidação do explante, baixa taxa de brotações, enraizamento, e acúmulo de substâncias tóxicas (NEPOMUCENO et al., 2009)

O pH influencia na disponibilidade de nutrientes, reguladores de crescimento e no nível de solidificação do ágar no meio de cultivo (HUDA et al., 2009). Se ajustado, promove um maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Para um crescimento adequado da maioria das espécies, a faixa de 5,0 - 6,5 é o mais adequado, sendo que se os níveis de pH forem inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, poderá ocorrer paralisação do crescimento e desenvolvimento *in vitro* (PASQUAL et al., 2002; BHATIA & ASHWATH, 2005).

Já o microambiente dentro dos frascos de cultivo parece ser um ambiente homogêneo, mas é um dos responsáveis pela variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são os tipos de frasco, tampa e quantidade de meio presente (DONINI et al., 2011). O etileno induz a abscisão foliar e tem sido um dos maiores problemas para o cultivo *in*

*vitro*, o acúmulo de gases é promovido por alguns tipos de fechamentos utilizados nos recipientes, que não permitem trocas gasosas com o meio externo. O uso de diferentes sistemas de vedação, com materiais mais porosos, tais como algodão ou filtros permeáveis a gases, favorecem as trocas gasosas (DAMIANI & SCHUCH, 2009; NEPOMUCENO et al., 2009).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a influência de faixas de pH e tipos de vedações no crescimento *in vitro* de mangabeira.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Ensaio I – Influência de diferentes faixas de pH no crescimento *in vitro* de mangabeira

O material vegetal utilizado na propagação *in vitro* foi retirado de frutos de *Hancornia speciosa* Gomes coletados em outubro de 2010, na Fazenda Gameleira, localizada no município de Montes Claros de Goiás – GO (16° 06' 20'' S – 51° 17' 11'' W) a 592m de altitude. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IF Goiano - Campus Rio Verde, GO.

Como fonte de explantes, foram utilizados segmentos nodais provenientes de plântulas preestabelecidas *in vitro*. Cada segmento tinha 2 cm de comprimento e duas gemas axilares.

Os explantes foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 20 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), com a metade da concentração original dos sais (WPM – 50%), mais as vitaminas proposta por White (1943), que diferenciava na faixa de pH utilizada (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5). No preparo do meio utilizaram 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica®). Os tubos inoculados foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25±3°C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

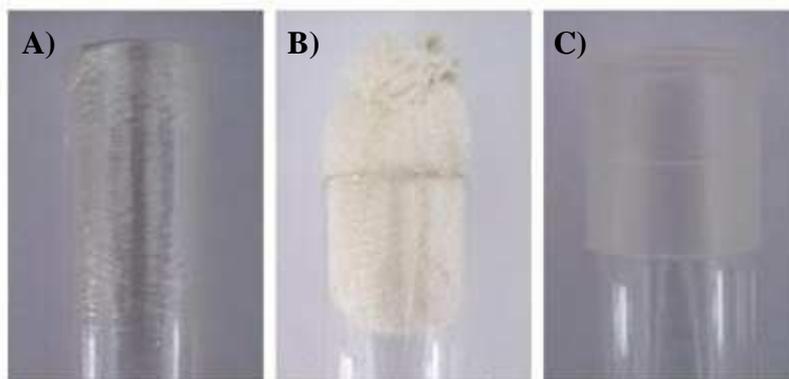
Após avaliação aos 30 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico ao realizado no 1º subcultivo, e conduzidos nas mesmas condições experimentais até a avaliação aos 60 dias. Aos 30 e 60 dias, avaliaram o comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (cm), número de

folhas expandidas, gemas, brotações laterais, porcentagem e comprimento médio de raízes adventícias (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com sete tratamentos e 20 repetições cada uma constituída por um tubo de ensaio, totalizando 140 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância com aplicação do teste F (5%) e as médias, analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2003).

## 2.2. Ensaio II – Tipos de vedações no crescimento *in vitro* de mangaba

Utilizou segmentos nodais como fonte de explantes com as mesmas características quanto ao comprimento e número de gemas axilares, dos utilizados no ensaio (I). Foram transferidos para tubos de cultivo (25 x 150 mm), contendo 20 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), com metade das concentrações original dos sais (WPM – 50%), mais as vitaminas proposta por White (1943), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica<sup>®</sup>), que diferenciava no tipo de vedação utilizada: película de PVC, tampão de algodão e tampa plástica (Figura 1). O pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem. Após a inoculação os tubos de ensaio foram mantidos nas mesmas condições de crescimento que as descritas no ensaio (I).



**Figura 1.** Diferentes tipos de vedações: A) Película de PVC; B) Tampão de algodão; C) Tampa plástica.

Após avaliação aos 30 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico aos que lhes deram origem (1° subcultivo), e conduzidos nas mesmas condições experimentais até a avaliação aos 60 dias. Aos 30 e 60 dias, avaliaram o comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando

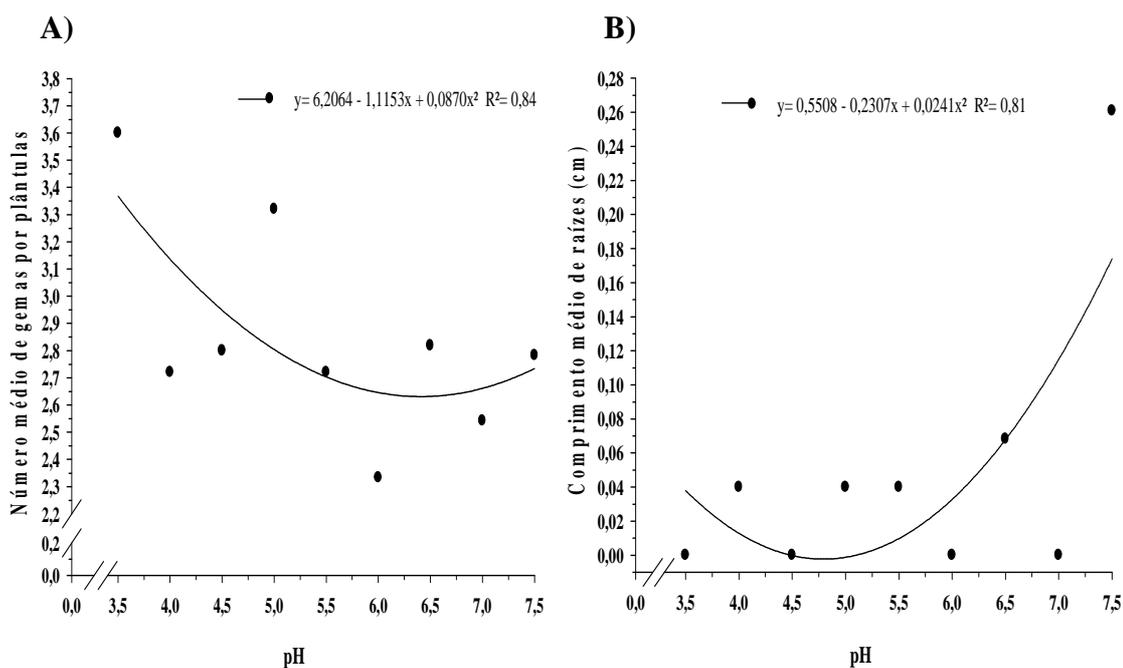
ocorreram) (cm), número de folhas expandidas, gemas, porcentagem e comprimento médio de raízes adventícias (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com três tratamentos e 30 repetições, cada uma constituída por um tubo de ensaio, totalizando 90 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

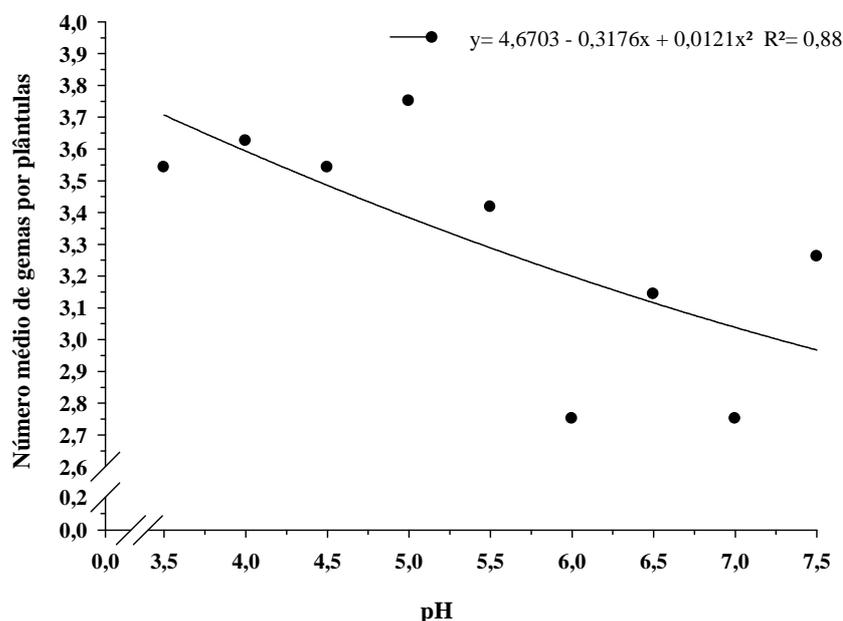
#### 3.1. Ensaio I – Influência de diferentes faixas de pH no crescimento *in vitro* de mangabeira

O modelo de regressão quadrática foi o mais adequado para explicar a evolução da regeneração das plântulas de mangaba em diferentes faixas de pH. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, os diferentes pH utilizados não influenciaram o comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas expandidas, brotações laterais e porcentagem de raízes adventícias. O número médio de gemas foi maior quando utilizada a faixa de pH em 3,5 e 5,0 foi obtido maior número médio de gemas (Figura 2A), enquanto em pH 7,5 ocorreu maior comprimento médio de raízes (Figura 2B).



**Figura 2.** Número médio de gemas (A) e comprimento médio de raízes (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), submetidas a diferentes faixas de pH, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Rio Verde - GO, 2012.

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, à medida que aumentou o pH, houve redução do número médio de gemas. Plântulas cultivadas em pH 5,0 exibiram maior número médio de gemas (Figura 3), o mesmo comportamento foi observado aos 30 dias de cultivo *in vitro*.



**Figura 3.** Número médio de gemas em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), submetidas a diferentes pH, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM – 50%. Rio Verde - GO, 2012.

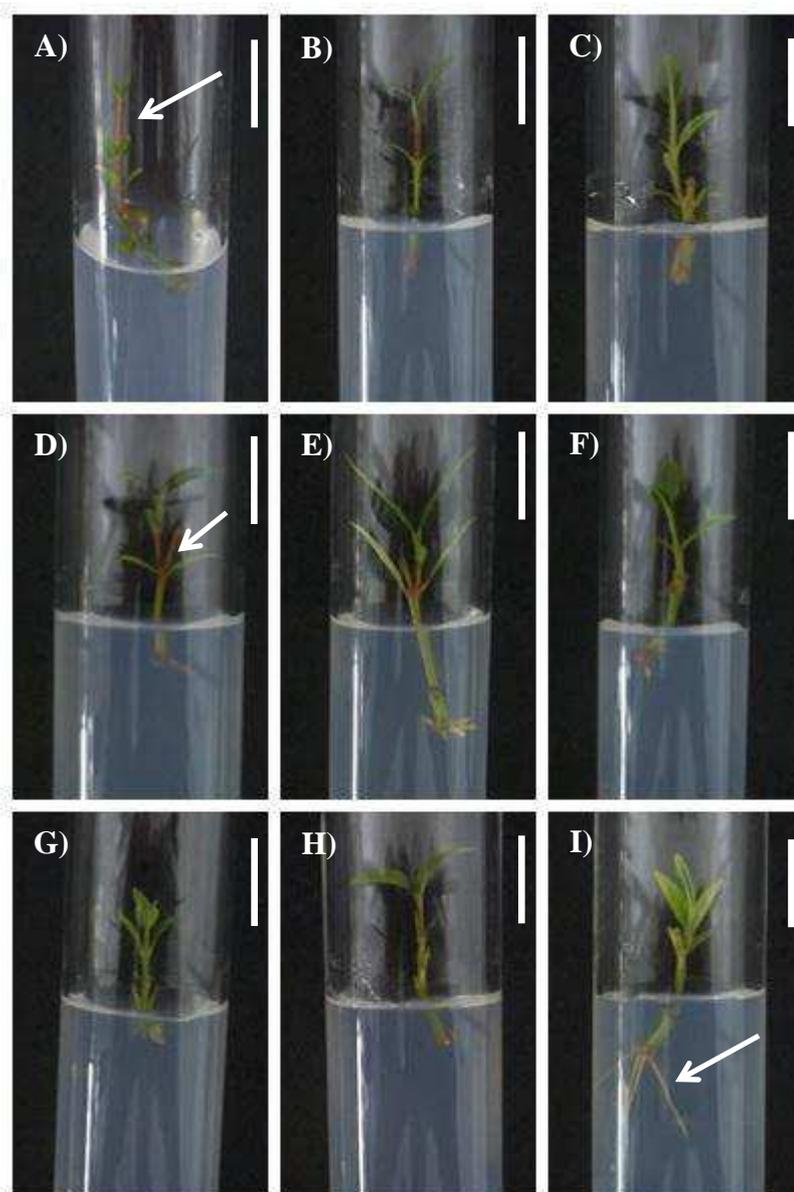
As diferentes faixas de pH utilizadas não exerceram influências sobre o comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas expandidas, brotações, porcentagem e comprimento médio de raízes. Verificando que em alguns tratamentos de pH (3,5; 4,0; 5,0 e 5,5) o caule das plântulas tinha coloração roxo-avermelhado, que é característica da espécie e foi observado por Léo et al. (2007) (Figura 4A, 4B, 4D e 4E). Em algumas faixas de pH (3,5; 6,5; 7,0 e 7,5) as plântulas obtiveram entrenós curtos, diferentemente dos outros valores de pH (Figura 4A, 4G, 4H e 4I).

Visualmente, aos 30 dias de cultivo *in vitro* as plântulas obtidas em pH 3,5 eram mais frágeis ao serem excisadas, com coloração verde-escura das folhas, que

apesar de expandidas eram menores do que as obtidas em outros tratamentos (Figura 4A). O meio de cultivo com esse pH ficou com o aspecto semissólido, pelo baixo pH, porque em pH quando superior a 6,0 o meio de cultivo fica muito sólido e inferior a 5,0 não é suficiente para solidificar (HUDA et al., 2009).

No tratamento com pH 5,0, ocorreu formação de folhas expandidas com coloração verde-escura, brotações laterais e raízes adventícias (Figura 4D). As folhas obtidas em pH 5,5 eram estreitas quando comparadas com os outros tratamentos, ocorrendo formação de brotações laterais e raízes adventícias (Figura 4E).

No restante dos tratamentos, as plântulas cultivadas eram de coloração verde-escura, com exceção do pH 7,5 (Figura 4I) que eram rígidas ao serem excisadas e, em alguns casos, houve formação de raízes adventícias (6,0 e 7,5). Não houve oxidação e formação de calos.

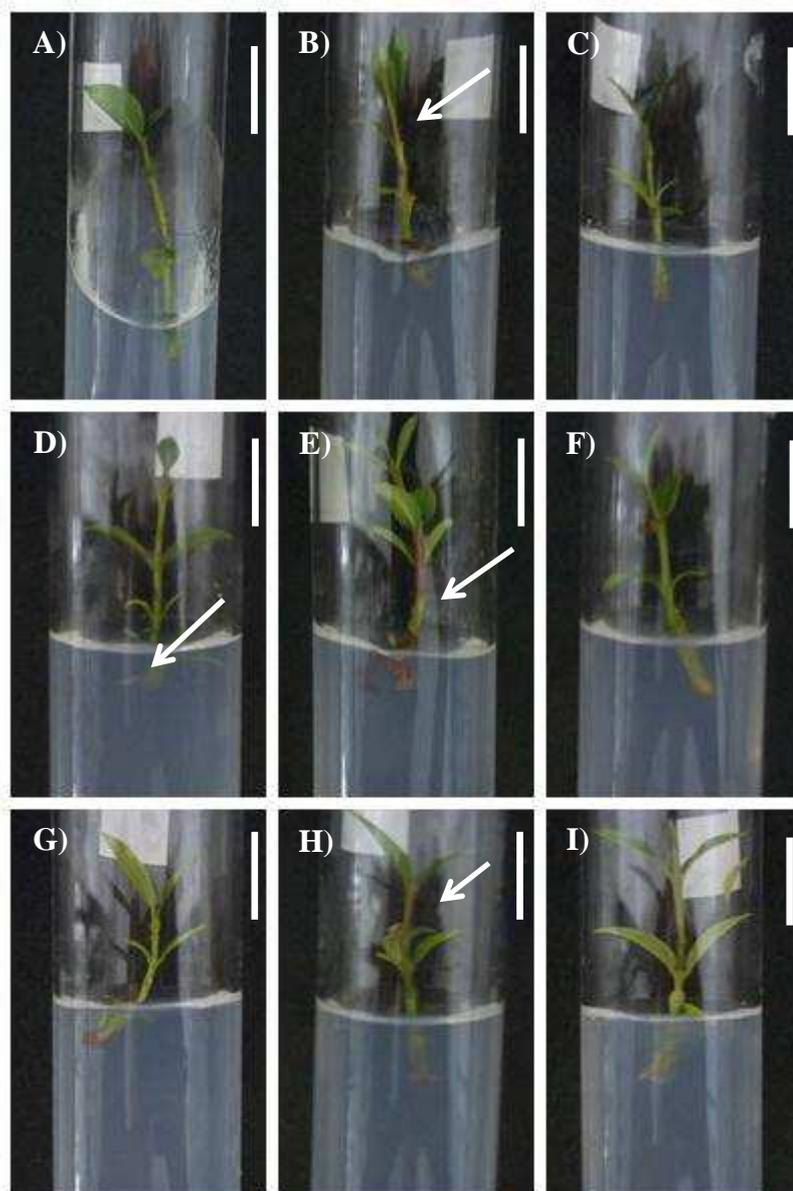


**Figura 4.** Diferentes faixas de pH no crescimento *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. A) 3,5; B) 4,0; C) 4,5; D) 5,0; E) 5,5; F) 6,0; G) 6,5; H) 7,0 e I) 7,5. Coloração roxo-avermelhada no caule, brotações laterais e raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

Visualmente, plântulas cultivadas aos 60 dias em pH 3,5, ao contrário das obtidas aos 30 dias de cultivo *in vitro*, eram bem formadas e vigorosas, com coloração verde-escura e suas folhas expandidas eram maiores (Figura 5A). O meio de cultivo dessa faixa de pH ficou semissólido, o que ocorreu pelo uso de pH abaixo de 5 e que não permite uma boa gelificação (BHATIA & ASHWATH, 2005).

Na faixa de pH 5,0 não ocorreu a coloração roxo-avermelhado do caule, diferindo do observado aos 30 dias, e as plântulas obtidas tinham entrenós curtos, suas folhas eram expandidas com coloração verde-escura e houve formação de raízes adventícias (Figura 5D).

Nas faixas de pH 4,0, 5,5 e 7,0 verificou-se a coloração roxo-avermelhado no caule das plântulas (Figura 5B, 5E e 5H). No restante das faixas de pH as plântulas obtidas eram de coloração verde bem acentuada, com exceção do pH 5,5 e 7,5 (Figura 5E e 5I) e não houve formação de raízes adventícias.



**Figura 5.** Diferentes faixas de pH no crescimento *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. A) 3,5; B) 4,0; C) 4,5; D) 5,0; E) 5,5; F) 6,0; G) 6,5; H) 7,0 e I) 7,5.

Coloração roxo-avermelhada no caule e raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

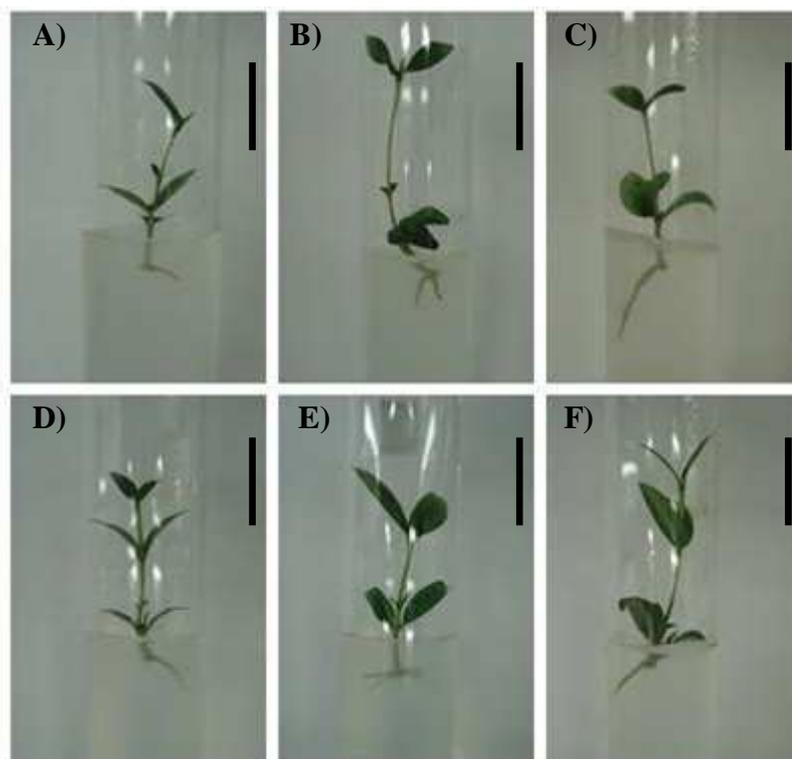
Avaliando a influência de diferentes pH (4,5, 5,0 e 5,75) no crescimento *in vitro* de *Plantago almogravensis* e *P. algarbiensis*, Martins et al. (2011) não observaram maior proliferação *in vitro* dos explantes e enraizamento. Ostrolucká et al. (2010) observaram que em pH 5,5 foi obtido maior proliferação de brotações para *Vaccinium vitis-idaea* L. cv. Koralle, enquanto para a cultivar Red Pearl o maior número de brotações foi obtido com pH 4,0. Para *Corchorus oliatorius*, o pH 5,5 também favoreceu maior proliferação de brotações (HUDA et al., 2009). Para tomate cv. Red Coat, a faixa de pH de 5,5 - 6,0 promoveu maior comprimento médio da parte aérea, sendo que numa faixa mais baixa (4,5-5,0) ou alta (6,5-7,5) de pH que esse intervalo ocorreu redução da parte aérea (BHATIA & ASHWATH, 2005). Para maior crescimento *in vitro* e multiplicação de brotações de *Chlorophytum arundinaceum*, o pH 5,9 foi o mais adequado (SAMANTARAY & MAITI, 2011). Não obstante, EBRAHIM & IBRAHIM (2000) relatam que a maior taxa de multiplicação de *Maranta leuconeura* ocorreu em pH 5,7. Enquanto Afroz et al. (2010) observaram que meio de cultivo com pH ajustado para 5,7 foi o melhor para a proliferação de brotações de *Asparagus racemosus* Wild.

Para maior taxa de enraizamento de *Prunus dulcis* Mill. cv. Shahrood 8 o pH 5,7 foi o mais adequado, enquanto para a cultivar Shahrood 10 o pH 4,8 favoreceu maior taxa de enraizamento (SHEKAFANDEH, 2010).

Com os resultados obtidos no trabalho, verifica-se que o pH 5,0 foi o mais adequado para o crescimento *in vitro* de mangabeira, com formação de maior número médio de gemas. Esta faixa de pH mais adequado fica dentro do utilizado pela maioria das espécies (5,0 - 6,5).

### **3.2. Ensaio II – Tipos de vedações no crescimento *in vitro* de mangabeira**

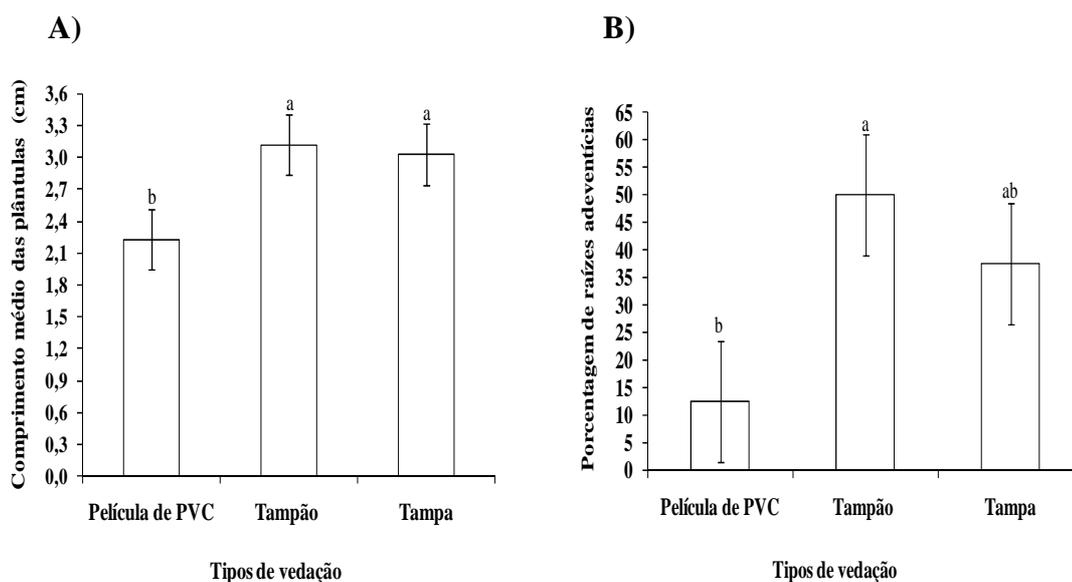
Foi observada a regeneração dos explantes em plântulas em todos os tratamentos avaliados. Independente do tipo de vedação utilizada, as plântulas obtidas eram bem formadas, vigorosas, sem alterações morfológicas ou oxidadas, tinham coloração verde-escura bem acentuada, ocorrendo a formação de raízes adventícias e não houve formação de calos (Figura 6A, 6B, 6C, 6D, 6E e 6F).



**Figura 6.** Crescimento *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes tipos de vedações. Plântulas aos 30 dias de cultivo *in vitro* em película de PVC (A); tampão de algodão (B) e tampa plástica (C). Plântulas aos 60 dias de cultivo *in vitro* em película de PVC (D); tampão de algodão (E) e tampa plástica (F) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

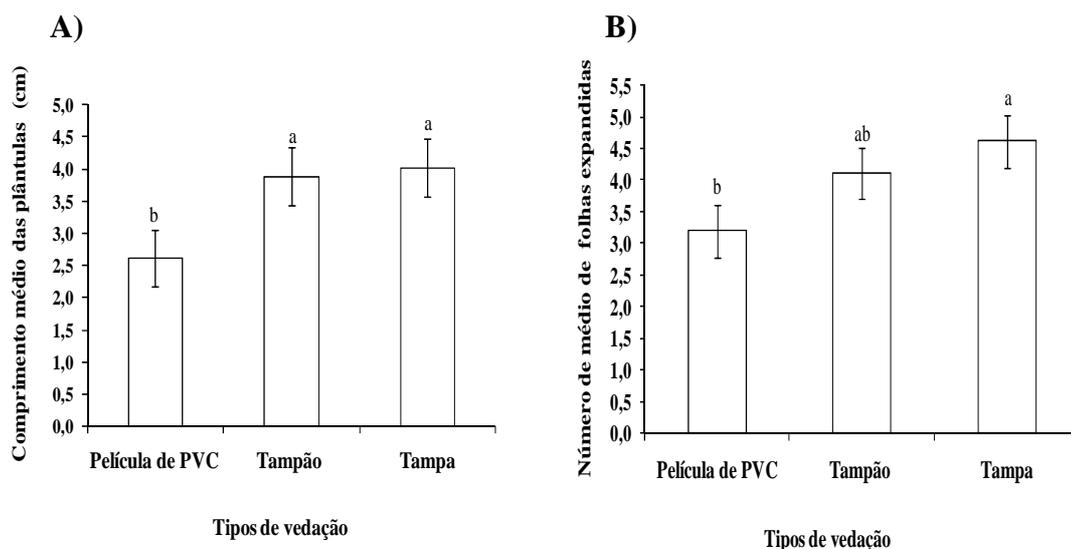
Os diferentes tipos de vedações não influenciaram o comprimento médio de raízes, número médio de folhas expandidas e gemas aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, quando utilizou tampão de algodão e tampa plástica, foram obtidos os maiores valores para comprimento médio de parte aérea, 3,12 e 3,03cm respectivamente (Figura 7A). O tampão de algodão proporcionou maior porcentagem de raízes adventícias (50%) (Figura 7B).



**Figura 7.** Comprimento médio (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (A) e porcentagem de raízes adventícias (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 30 dias cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações. Rio Verde - GO, 2012. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre os tipos de meio de cultivo e minúscula entre as concentrações dos sais, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Plântulas cultivadas aos 60 dias em tampão de algodão e tampa plástica obtiveram maior comprimento médio de parte aérea, 3,89 e 4,02 cm respectivamente (Figura 8A). O uso de tampa plástica proporcionou maior número médio de folhas expandidas (Figura 8B).



**Figura 8.** Comprimento médio (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (A) e número médio de folhas expandidas (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações. Rio Verde - GO, 2012. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula entre os tipos de meio de cultivo e minúscula entre as concentrações dos sais, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Não houve influência dos diferentes tipos de vedações aos 60 dias de cultivo *in vitro* para número médio de gemas, porcentagem de raízes e comprimento médio de raízes adventícias. A utilização de tampão de algodão proporciona maior aeração no interior do tubo e maior troca gasosa entre o ambiente interno e o ar atmosférico, reduzindo a umidade relativa e o acúmulo de etileno no interior dos frascos, melhorando a transpiração da planta e o desenvolvimento de suas folhas (RIBEIRO et al., 2007; DAMIANI & SCHUCH, 2009; HAWERROTH et al., 2010).

Procurando avaliar o efeito de diferentes tipos de vedações, alguns autores descrevem experimentos similares aos descritos neste trabalho, como Santana et al. (2001) que trabalhando com araticum (*Annona glabra* L.) encontraram resultados semelhantes, em que o uso de tampão de algodão proporcionou maior comprimento médio das brotações. Entretanto, Damiani e Schuch (2009) observaram que o tampão de algodão proporcionou maior comprimento médio de raízes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). Donini et al. (2011), porém trabalhando com oliveira ‘Arbequina’ observaram que quando foi utilizada tampa plástica ou papel alumínio, ocorreu maior número de brotações, e o papel alumínio proporcionou maior número de folhas.

Desta forma, verificou-se que o uso de tampão de algodão foi o mais adequado para o crescimento *in vitro* das plântulas de mangabeira, proporcionou maior comprimento médio de parte aérea e porcentagem de raízes adventícias.

#### 4. CONCLUSÃO

Para número médio de gemas de plântulas de mangabeira o ajuste de pH 5,0 foi o mais adequado.

O uso de tampão de algodão proporcionou maior comprimento médio de parte aérea e porcentagem de raízes adventícias em plântulas de mangabeira.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFROZ, F.; JAHAN, M. A. A.; SAYEED HASSAN, A. K. M; KHATUN, R. *In vitro* plant regeneration from axillary buds of *Asparagus racemosus* Wild, a medicinal plant. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 45, n. 3, p. 255-260, 2010.

BARROS, D. I.; BRUNO, R de L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação. **Revista Acta Tecnológica**, v. 5, n. 1, p. 31-43, 2010.

BHATIA, P.; ASHWATH, N. Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato. **Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 7-10, 2005.

CALDAS, L. S.; MACHADO, L. de L.; CALDAS, S. C.; CAMPOS, M. L.; CALDAS, J. A.; PHARIS, R. P.; PEREIRA-NETTO, A. B. Growth-active gibberellins overcome the very slow shoot growth of *Hancornia speciosa*, an important fruit tree from the Brazilian “Cerrado”. **Trees**, v. 23, p. 1229-1235, 2009.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1012-1017, 2009.

DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira ‘Arbequina’. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, 2011.

EBRAHIM, M. K. H.; IBRAHIM, I. A. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. **Scientia Horticulturae**, v. 86, n. 3, p. 211-221, 2000.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF- $\kappa$ B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1064-1069, 2009.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - versão 4,3. DEX/UFLA - Lavras, MG, 2003.

HAWERROTH, F. J.; SOUZA, A. L. K. de; AFFONSO, L. B.; NASCIMENTO, D. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação fotoautotrófica *in vitro* de pereiras 'Abatel Fetel'. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1439-1443, 2010.

HUDA, K. M. K.; BHUIYAN, M. S. R.; ZEBBA, N.; BANU, S. A.; MAHMUD, F.; KHATUN, A. Effect of FeSO<sub>4</sub> and pH on shoot regeration from the cotyledonary explants of Tossa Jute. **Plant Omics Journal**, v. 2, n. 5, p. 190-196, 2009.

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

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

MARTINS, N.; GONÇALVES, S.; PALMA, T.; ROMANO, A. The influence of low pH on *in vitro* growth and biochemical parameters of *Plantago almogravensis* and *P. algarbiensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 1, p. 113-121, 2011.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. de S.; QUEIROZ, S. R. de O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. de. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v. 33, n. 3, p. 481-490, 2009.

OSTROLUCKÁ, M. G.; GAJDOSOVÁ, A.; ONDRUSKOVÁ, E.; LATECKOVÁ, M.; LIBIAKOVÁ, G. Effect of médium pH on axillary shoot proliferation of selected *Vaccinium vitis-idaea* L. cultivars. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 52, n. 2, p. 92-96, 2010.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. de O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira "Poncã" em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002.

RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L. C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 843-845, 2007.

SAMANTARAY, S.; MAITI, S. Factors influencing rapid clonal propagation of *Chlorophytum arundinaceum* (Liliales: Liliaceae), an endangered medicinal plant. **Revista de Biologia Tropical**, v. 59, n. 1, p. 435-445, 2011.

SANTANA, J. R. de S.; PAIVA, R.; SOUZA, A. V. de; OLIVEIRA, L. M. de. Effect of different culture tube caps and concentrations of activated charcoal and sucrose on *in vitro* growth and budding induction of *Annona glabra* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 916-923, 2011.

SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SHEKAFANDESH, A. The effects of pH levels and plant growth regulators on *in vitro* regeneration of Almond (*Prunus dulcis* Mill.). **World Applied Sciences Journal**, v. 8, n. 11, p. 1322-1326, 2010.

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

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; CAMPOS, A. C. A. L.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C. Germinação de sementes de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1180-1182, 2007b.

SOARES, F. P.; PAIVA, P.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320 p., 2006.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v. 7, p. 53-65, 1943.

### CAPÍTULO III

#### ***IN VITRO* CULTIVATION OF *Hancornia speciosa* Gomes: THE PHYSICAL CONSTITUTION OF THE CULTURE MEDIUM, SUCROSE CONCENTRATIONS, AND GROWTH CONDITIONS**

**ABSTRACT** - Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) is a tree species native to the Cerrado, and it is of great importance not only because its fruits are used in the juice and ice cream industries, but also because it is a rubber-producing plant. The objective of this study was to evaluate the effect of the physical constitution of the culture medium, different concentrations of sucrose, and different growth conditions on the germination of seeds and growth of explants of mangaba in two *in vitro* assays. In assay I, the physical constitution of a medium (solid and liquid WPM) and different concentrations of sucrose (0, 15, 30, 45, 60, 75, and 90 g L<sup>-1</sup>) were tested; we used a completely randomized design, and seed germination was the measured variable. Similarly, assay II used a completely randomized design to evaluate the effect of different growth conditions (with and without agitation) on the *in vitro* growth of explants. Daily counts were performed to determine the germination percentage, the germination rate index, and the average time to obtain 50% of germination (for assay I alone). After 30 days of cultivation, we evaluated the average length of shoots (cm), number of buds, and number of expanded leaves (in assay II alone). Our results showed that mangaba had the highest percentage of germination and of vitality when inoculated in a liquid medium, without sucrose or with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose. The medium without agitation resulted in a better growth of explants, measured by the average length and average number of buds.

## **CULTIVO *IN VITRO* DE *Hancornia speciosa* Gomes: CONSTITUIÇÃO FÍSICA DO MEIO, CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E CONDIÇÕES DE CULTIVO**

**RESUMO** - A mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, de grande importância por produzir matéria prima para a indústria de sucos e sorvetes, o que lhe destaca como planta frutífera e produtora de borracha. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito da constituição física do meio, diferentes concentrações de sacarose e condições de cultivo na germinação de sementes e crescimento de explantes de *Hancornia speciosa* Gomes em dois ensaios *in vitro*. No ensaio I testou-se a constituição física do meio (WPM sólido e líquido) e diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 g L<sup>-1</sup>), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, na germinação de sementes. O ensaio II utilizou um delineamento inteiramente casualizado para avaliar diferentes condições de cultivo (com e sem agitação) no crescimento *in vitro* de explantes. Foram realizadas contagens diárias para determinar a porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio para a ocorrência de 50% de germinação (apenas para o ensaio I). Após 30 dias de cultivo avaliou-se: comprimento médio da parte aérea (cm), o número de gemas e de folhas expandidas (apenas no ensaio II). Conclui-se que as sementes de mangaba quando inoculadas em meio líquido, na ausência ou com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose obtêm os maiores índices de porcentagem de germinação e vigor. Já o meio líquido sem agitação propicia maior crescimento dos explantes de mangaba, constatado por meio do comprimento e número médio de gemas.

## INTRODUCTION

Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) is a tropical tree species that is native to Brazil. It is found in the coastal plains and lowlands of the Northeast and in the Cerrado, which occupies the Midwest, North, and Southeast regions. It provides primary materials for the juice and ice cream industries, and it is a rubber-producing plant (LEDO et al., 2007; SOARES et al., 2007a).

The harvest of its products is achieved mainly through extraction. According to Vieira et al. (2006), the physical and mechanical characteristics of the rubber obtained from mangaba latex are suitable for several technological, industrial, and commercial applications (SOARES et al., 2007a).

The propagation of the species is performed sexually; however, this method is not satisfactory because the plant has highly recalcitrant seeds. In addition, the pulp of the fruit inhibits germination (SOARES et al., 2009). Therefore, its seeds should be sown right after removing the pulp or up to 48 hours after the removal of fruits because the germination power decreases rapidly after the fourth day (SOARES et al., 2007b). In general, the percentage of germination is low, and the emergence and growth of seedlings is slow (VIEIRA et al., 2006).

In this context, micropropagation using tissue culture techniques is useful for propagating different species that, like mangaba, have a low rate of germination. Even though the process involves different stages following a defined protocol for any species, the protocol might be optimized to obtain high quality plants with low production costs (LEDO et al., 2007; REIS et al., 2008).

Cultivation media seek to meet the needs of the species that is being grown and to provide the nutrients necessary for *in vitro* growth. A medium is composed of essential and optional components required for plant growth, which vary according with the species, cultivar, or explant that is used and must be experimentally defined for each particular case. Moreover, all the nutrients in a cultivation medium should be present in optimum concentrations to ensure the growth of explants (BASSAN et al., 2006; FICK et al., 2007). Solutions of salts and sugars are also used for cultivation media, and these solutions not only exert a nutritive effect but also influence cellular growth and morphogenesis through their osmotic properties (BRAUN et al., 2010).

Likewise, physical characteristics of culture media play an important role in the success of the *in vitro* establishment of plants. There are certain species whose explants develop better in a liquid medium, others whose explants develop better in a solid medium, and others that respond best to a liquid medium with support (ADELBERG et al., 2010; MEHROTRA et al., 2007).

Even though agar is widely used due to its effectiveness as a gelling agent, liquid medium systems has gained importance due to the greater agility in their preparation. In addition, the greater contact between explants and culture medium may increase the absorption of water and nutrients, resulting in higher nutrient assimilation and, therefore, in a more vigorous explant growth, especially when liquid media are used in combination with aeration systems. Furthermore, liquid culture media with aeration systems make automation of the micropropagation process possible and can be used on a commercial scale (FARIA et al., 2006; SILVA et al., 2007).

The objective of this study was to evaluate the effect of the physical constitution of the medium, different sucrose concentrations, and growth conditions on the germination of seeds and growth of explants of mangaba in two *in vitro* assays.

## MATERIALS AND METHODS

The plant material used in the *in vitro* propagation was obtained from fruits of *Hancornia speciosa* Gomes, which were collected in September of 2010, at the Gameleira farm, located in the municipality of Montes Claros de Goiás – GO, at 592 m in altitude. The assays were conducted in the Laboratory of Plant Tissue Cultivation of IFGoiano – Rio Verde Campus, GO.

### **Assay I – Effects of the physical constitution of the culture medium and different concentrations of sucrose on the *in vitro* germination of *Hancornia speciosa* Gomes**

The removal of fruit pulp was performed manually with the help of a number 30 aluminum mesh sieve. To remove the excess of fruit flesh from seeds, a solution of 5% sodium hydroxide was used for 5 minutes. Subsequently, the seeds were manually scarified under running water to remove the tegument and submersed for 10 minutes in

a container with running water with three drops of Tween (80%). Then, they were immersed in a bowl with 70% (v/v) alcohol for 1 minute and in a solution of sodium hypochlorite (20%) for 20 minutes. A triple wash was performed in a laminar flow hood with distilled and autoclaved water.

The seeds were cultivated in bottles (12cm x 5cm) containing 15 mL of WPM culture medium (LLOYD and MCCOWN, 1980) at half of the original concentration; moreover, the media prepared differed in their physical constitution (liquid and solid) and in the sucrose concentration (0, 15, 30, 45, 60, 75, and 90 g L<sup>-1</sup>). For the preparation of the solid medium, 3.5g L<sup>-1</sup> of agar (Dinâmica<sup>®</sup>) was used. The pH was adjusted to 5.7 ± 0.3 before autoclaving. The inoculated bottles were maintained under a photoperiod of 16 hours with a temperature of 25 ± 3°C, a relative humidity of 45 - 46%, and an active photosynthetic radiation of 45 - 55 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Daily counts were performed to determine the complete stabilization of the germination percentage. The germination rate index (GRI) and the average time to obtain 50% of germination (T50) were also assessed. The GRI was calculated according to Maguirre (1962), and the T50 was measured according to Resende (2009). Seeds displaying radicle protrusion were considered to have germinated.

The experiment was set up using a completely randomized design, in a 2x7 factorial design (culture medium x sucrose concentration); similarly, each treatment was replicated 20 times, one repetition per bottle, comprising a total of 280 experimental units. The numerical data were statistically evaluated through analysis of variance with the application of the F test at a level of probability of 5%, and the means were analyzed through linear regression using SISVAR software (FERREIRA, 2003).

## **Assay II – Effects of different growth conditions on explants of *Hancornia speciosa*** **Gomes**

Nodal segments from *in vitro*-established seeds were used as the source of explants. Each segment was 2 cm in length and had two buds. The culture medium was WPM (50%) with two different physical constitutions, liquid and solid. Agar was used to solidify the medium (3.5 g L<sup>-1</sup>), while the liquid medium was maintained both with and without agitation. Bottles (12 cm x 5 cm) containing 15 mL of culture medium were

used. The agitation of the medium was performed with an orbital shaker (Nova Técnica NT 712) at a rotation speed of 90 rpm.

The pH was adjusted to  $5.7 \pm 0.3$  before autoclaving. The inoculated bottles were kept under a photoperiod of 16 hours, at a temperature of  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , a relative humidity of 45 - 46%, and an active photosynthetic radiation of  $45 - 55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

After 30 days, the shoot average length (cm), the number of buds, and the number of leaves were recorded.

The experiment was set up using a completely randomized design, with 3 treatments replicated 25 times; each repetition consisted of a bottle containing 3 explants, comprising a total of 225 experimental units. The numeric data were statistically evaluated through analysis of variance, and the means were tested using a Tukey's test at a level of probability of 5%, using SISVAR software (FERREIRA, 2003).

## RESULTS AND DISCUSSION

### **Assay I – Effects of the physical constitution of the culture medium and different concentrations of sucrose on the *in vitro* germination of *Hancornia speciosa* Gomes**

Seeds generated seedlings in all the treatments, and no fungal or bacterial contamination was observed. The first radicle protrusions were observed 15 days following inoculation, and at 25 days, the emergence of the epicotyl was observed. The latter, the cotyledonary nodes and the first pair of leaves had a purple-yellow coloration, which is characteristic of this plant. The same observation was made by Ledo et al. (2007).

In all the treatments, the seeds generated well-formed, vigorous plants without morphological alterations or oxidation and without the formation of calluses. Visually, plants grown in the solid medium were more vigorous and rigid when removed. The green color of the stem and leaves was accentuated, and there was a profuse growth of adventitious roots (Figure 1A). At the beginning of germination, next to the hypocotyls, a bulge of yellowish color was noted from where the roots emerged (Figure 1B).

In contrast, plants grown in the liquid medium initially displayed an appearance of over-watering, and the leaves and stems were initially a light green color and progressively acquired a darker color (Figure 1C). The hypocotyl was clear, almost white, with few adventitious roots and without the previously mentioned bulge (Figure 1D). In addition, the seedlings were more fragile after being removed.

A quadratic regression model was the most appropriate to explain the development of mangaba seedling generation. There was an effect of both the consistency of the medium and the sucrose concentration (Figure 2).

A higher percentage of germination (45%) was observed in the liquid medium (Figure 2A). As the concentration of sucrose increased, there was a reduction in the percentage of germination. A higher average value was obtained in the medium without sucrose and in the medium supplemented with only 15 g L<sup>-1</sup> sucrose. The obtained values were 60 and 62%, respectively.

For the germination rate index, a behavior similar to that of the germination percentage was observed, i.e., the highest average value (0.28) was observed in the liquid medium (Figure 2B). As the concentration of sucrose increased, a reduction in the vigor of seeds was observed. The germination rate was greater when there was no sucrose in the culture medium; the average value for this treatment was 0.39 (Figure 2B).

Seeds cultivated in the solid medium reached 50% of germination (T50 in 2.91 days, which represents a fast germination (Figure 2C). Regarding the different sucrose concentrations, the lowest average values of T50 were obtained with the medium supplemented with 90 g L<sup>-1</sup> of sucrose (1.39).

The results of T50 differed from those found for GRI and germination percentage. Despite a rapid germination, the combination of the solid medium and high concentrations of sucrose negatively affected the germination percentage and the vigor of seeds. This outcome might be due to the formation of nutrient gradients that may occur in solid media; in contrast, those gradients do not occur in liquid media because these tend to be more homogenous and, therefore, might lead to greater growth of root and shoot systems of explants (FARIA et al., 2006).

Seeking to optimize culture media for different microorganisms or plants, several authors described experiments similar to the one described here. For instance, Faria et al. (2006) found similar results with *Oncidium baueri* Lindl. (Orquidaceae), where use of a liquid medium resulted in greater growth of shoots, roots, and buds.

Coelho et al. (2001) observed a higher percentage of germination of sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] *in vitro* with seeds inoculated into an MS-50% liquid medium.

Regarding the sucrose concentrations, our results are in agreement with those obtained by Soares et al. (2009), where the greatest percentage of *in vitro* germination of mangaba was found in an MS-50% and WPM medium supplemented with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose. In addition, Pinheiro et al. (2001) found a greater percentage of germination of mangaba seeds when inoculated into a liquid MS medium with less than 20 g L<sup>-1</sup> of sucrose. Likewise, Reis et al. (2008) obtained a higher percentage of germination and a faster GRI *in vitro* with *Melissa officinalis* L. seeds inoculated into an MS-25% medium supplemented with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose.

Similarly, beet seeds pre-soaked in gibberellic acid and inoculated into an MS medium supplemented with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose showed a greater percentage of germination. Yet, more vigorous seedlings were obtained from seeds kept in media supplemented with 15 or 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose (BRAUN et al., 2010).

Depending on the species, there is no need to supplement culture media with sucrose. Yet, sucrose might help maintaining seedlings *in vitro* for longer periods (SOARES et al., 2009; BRAUN et al., 2010).

To conclude, the liquid medium with the lowest concentration of sucrose promoted the greatest germination of mangaba seeds.

## **Assay II – Effects of different growth conditions on explants of *Hancornia speciosa*** **Gomes**

According to the analysis of variance, both the average length of explants and the average number of buds reached higher values in plants cultivated in the liquid medium without agitation. The average length was 2.72 cm in the liquid medium without agitation and 2.16 cm in the liquid medium with agitation. However, those values did not differ from the one obtained with the solid medium, which was 2.45 cm (Figure 3A). Regarding the average number of buds, the values were 3.01 and 2.42 for the liquid medium without and with agitation, respectively. Similarly, those values did not differ from the one obtained with the solid medium, which was 2.73 (Figure 3B).

Likewise, the average number of expanded leaves showed no difference in value among different cultivation conditions.

With visual observation, it was found that inoculated nodal segments generated seedlings in all treatments. No fungal or bacterial contamination was found. Seedlings in the liquid medium with agitation were etiolated and, as a result, more fragile, which was corroborated when the plants were removed. The leaves and the stems were depigmented (clear green). The leaves were rudimentary, although they completely expanded, and there was no formation of adventitious roots (Figures 4A and 4B). Moreover, several explants suffered necrosis and oxidation (Figures 4C and 4D).

In contrast, seedlings obtained from the liquid medium without agitation and from the solid medium were more rigid after being removed than were those obtained from the liquid medium with agitation. Leaves and stems displayed a more accentuated dark green coloration, which is characteristic of the species (Figures 4E and 4F). There was a greater growth of leaves and adventitious roots and no necrosis or oxidation of explants (Figures 4G and 4H).

In addition, seedlings obtained from the solid medium had less leaves and adventitious roots than those obtained from the liquid medium without agitation (Figures 3K and 3L). In addition, no necrosis or oxidation of the explants was observed. According to Bassan et al. (2006), who worked with explants similar to those in this study, the lack of phenol oxidation in the explants of canafistula (*Peltophorum dubium* (Speng) is attributed to the reduced concentration of phenols in the tissues or to the seminal origin of the explants because the majority of authors consider the age of the explants to be directly related to the formation of phenolic compounds in *in vitro* cultures.

Several species require support or agitation to provide oxygen for the metabolism of explants, which ensures the division and differentiation of sprouts. However, when the liquid medium was agitated, the growth of nodal segments of mangaba was unsatisfactory and suffered from oxidation and necrosis. This outcome decreased the capacity of regeneration of the explants and reduced the number of seedlings obtained at the end of the cultivation experiment.

The results using liquid medium without agitation indicated that the constant immersion of mangaba explants in the culture medium did not affect the ability to obtain healthy seedlings. The technique was efficient because it produced the best seedlings among all the treatments.

With the elimination of agar from the culture medium, the cultivation process became more flexible and less onerous. Because liquid media lack agar, they are easy to prepare, and a lower quantity of medium can be used per experimental unit; thus, the production process is optimized. In commercial terms, this efficiency constitutes a great advantage because it allows for mass production with lower costs and for producing large quantities of healthy seedlings available for purchase at accessible prices. These advantages were also described by Faria et al. (2006) and Pereira and Fortes (2003), who showed the benefits of *in vitro* culture using liquid media.

## CONCLUSIONS

Mangaba seeds showed the best indices of germination percentage and germination rate when inoculated into a liquid medium, with no sucrose or 15.0 g L<sup>-1</sup> of sucrose. Likewise, liquid medium without agitation resulted in greater growth of mangaba explants.

## REFERENCES

- ADELBERG, J. W.; DELGADO, M. P.; TOMKINS, J. T. Spent medium analysis for liquid culture micropropagation of *Hemerocallis* on Murashige and Skoog medium. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, New York, v. 46, n. 1, p. 95-107, 2010.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de Canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BRAUN, H.; LOPES, J. C.; SOUZA, L. T. de; SCHMILDT; E. R.; CAVATTE, R. P. Q.; CAVATTE, P. C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 539-546, 2010.
- COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R. de; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.)

Benth.] *in vitro* e *ex-vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 38-48, 2001.

FARIA, R. T. de; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. da. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - versão 4,3. DEX/UFLA - Lavras, MG, 2003.

FICK, T. A.; BISOGNIN, D. A.; QUADROS, K. M. de; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. S. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de Louro-pardo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

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

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v.30, p.421-327, 1980.

MAGUIRRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p.176-177, 1962.

MEHROTRA, S.; GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K.; MISHRA, B. N. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 13, p. 1484-1492, 2007.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. de L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

PINHEIRO, C. Z. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008.

RESENDE, M de L.; SILVA, T. T. de A.; GUIMARÃES, R. M.; SILVA, E. A. A. da. Influência da luz e giberelina na velocidade de germinação das sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 149-154, 2009.

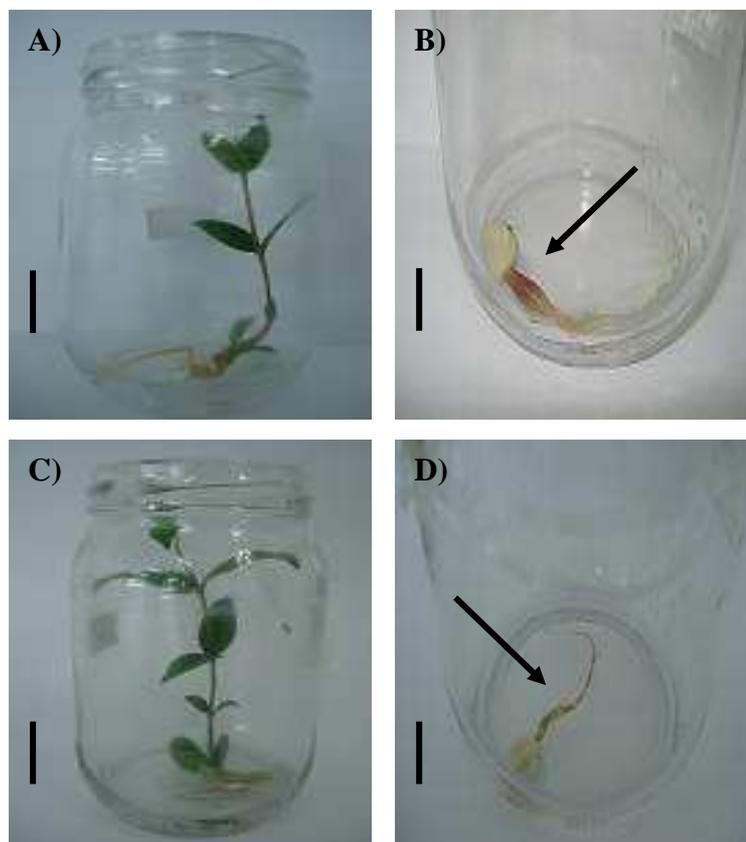
SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

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

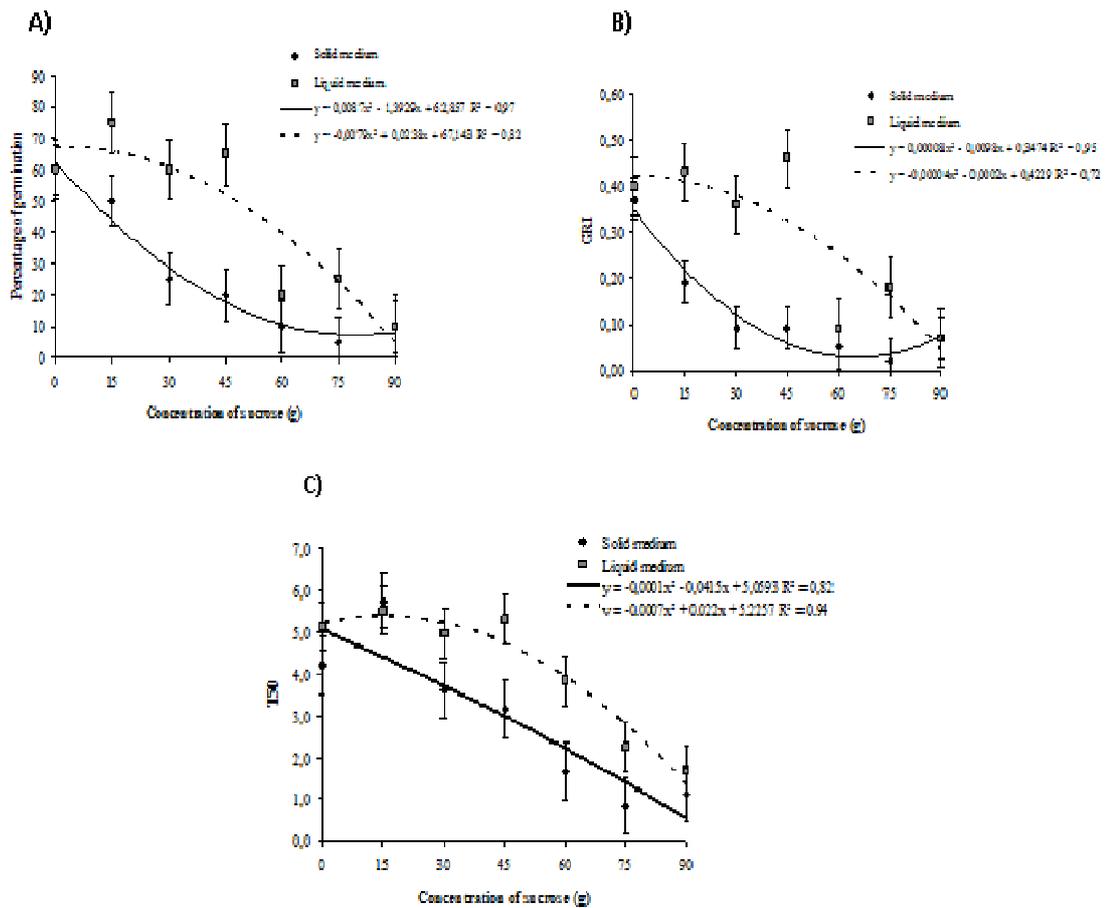
SOARES, F. P.; PAIVA, R.; CAMPOS, A. C. A. L.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C. Germinação de sementes de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1180-1182, 2007.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sob a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

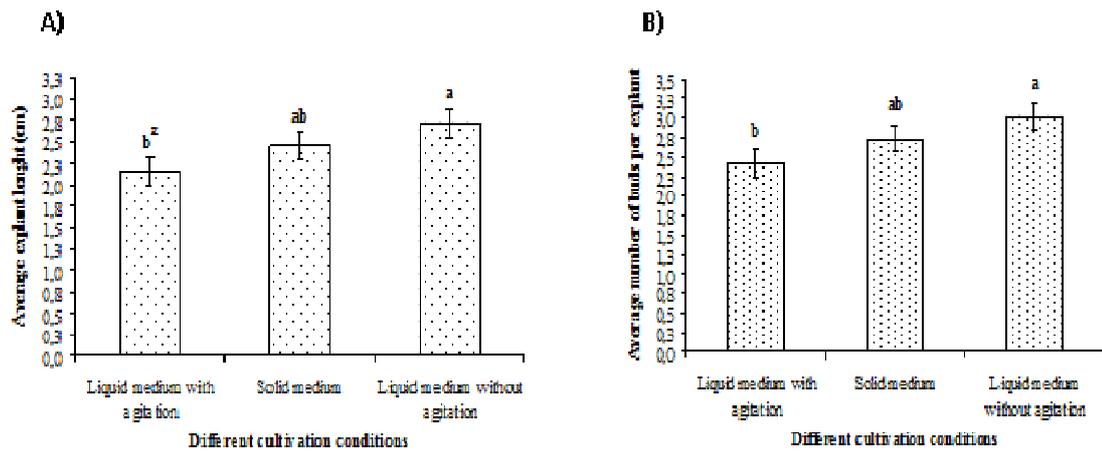
VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M.  
**Frutas nativas da Região Centro-Oeste.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia, 2006. 320 p.



**FIGURE 1** - Seedlings of *Hancornia speciosa* Gomes at 35 days of cultivation: A) solid medium with no sucrose; B) solid medium with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose; C) liquid medium with no sucrose; D) liquid medium with 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose. The arrows indicate the bulge of the hypocotyl. Bar = 10mm

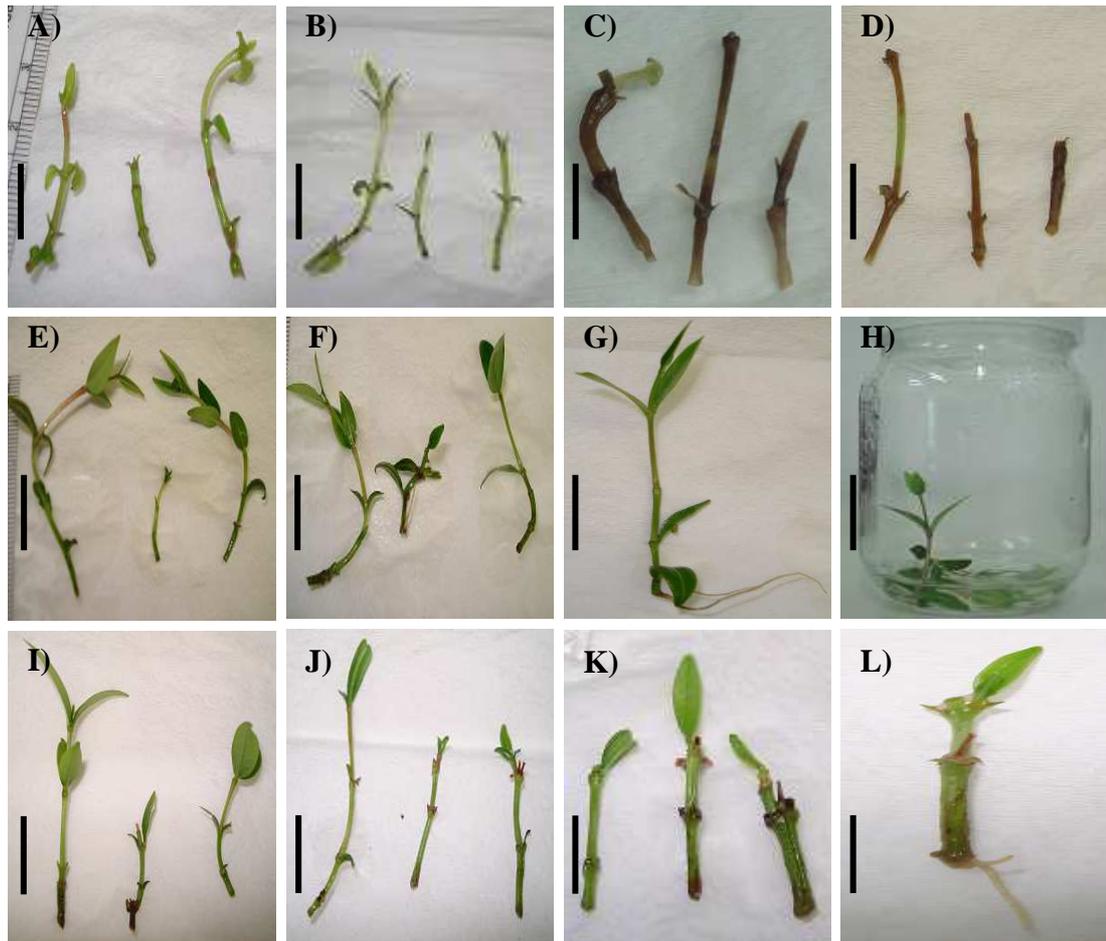


**FIGURE 2** - Percentage of germination (A), germination rate index (GRI) (B), and average time to obtain 50% of germination (T50) (C) of *Hancornia speciosa* Gomes seeds in different types of culture media and different sucrose concentrations.



<sup>z</sup> Means followed by same letter do not differ by Tukey test at 5% probability.

FIGURE 3 - Average explant length (A) and average number of buds (B) of *Hancornia speciosa* Gomes under different cultivation conditions.



**FIGURE 4** - *In vitro* growth of *Hancornia speciosa* Gomes after 30 days of cultivation. Liquid medium with agitation (A and B). Necrosed explants in liquid medium with agitation (C and D). Liquid medium without agitation (E, F, G, and H). Solid medium (I and J). Seedlings with few expanded leaves or roots in solid medium (K and L). Bar =10mm.

## CAPITULO IV

### CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE MANGABEIRA SOB EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO

#### RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar diferentes concentrações e reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de plântulas de mangabeira. No ensaio I, foram testadas três concentrações de AIA (0,0; 5,71 e 11,42  $\mu\text{M}$ ) e três concentrações de KIN (0,0; 4,65 e 9,29  $\mu\text{M}$ ). No ensaio II, com o mesmo delineamento do anterior, foram testadas ANA (0,0; 5,37 e 10,74  $\mu\text{M}$ ) e BAP (0,00; 4,44 e 8,88  $\mu\text{M}$ ). Em ambos os ensaios utilizando delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 3x 3, com 20 repetições, em que cada repetição era constituída por um tubo de ensaio. Aos 30 e 60 dias de cultivo avaliaram o comprimento médio das plântulas, número de gemas, folhas expandidas, brotações, raízes adventícias e formação de calos. Conclui-se que para o crescimento de explantes de mangaba *in vitro*, meio de cultivo em ausência de AIA suplementado com 4,65  $\mu\text{M}$  KIN foi o mais adequado, por propiciar maior comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas expandidas, gemas e brotações. Quanto ao uso de ANA e BAP a combinação de 5,37  $\mu\text{M}$  ANA/4,44  $\mu\text{M}$  BAP proporcionou maior comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas expandidas e gemas. Para o cultivo de plântulas de mangaba foi adequado a utilização de 4,65  $\mu\text{M}$  KIN em meio, proporcionando maior crescimento *in vitro* das plântulas.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa* Gomes, fitormônios, desenvolvimento vegetal

## CHAPTER IV

### ***IN VITRO* GROWTH AND DEVELOPMENT OF MANGABEIRA EXPLANTS UNDER EFFECT OF GROWTH REGULATORS**

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate different concentrations and growth regulators on *in vitro* culture of mangabeira explants. In the first stage, were tested three concentrations of IAA (0.0, 5.71 and 11.42  $\mu\text{M}$ ) and three concentrations of KIN (0.0, 4.65 and 9.29  $\mu\text{M}$ ). In trial II, with the same design of the previous were tested ANA (0.0, 5.37 and 10.74  $\mu\text{M}$ ) and BAP (0.00, 4.44 and 8.88  $\mu\text{M}$ ). In both trials were used a completely randomized design in a factorial 3 x 3, with 20 replicates, each replicate consisted of a test tube. At 30 and 60 days of culture were evaluated the average length of seedlings, number of buds, expanded leaves, shoots, adventitious roots and callus formation. Concluding that for *in vitro* mangaba explants growth, the culture medium in the absence of IAA supplemented with 4.65  $\mu\text{M}$  KIN was the most appropriate, because it provides higher average length of shoots, average number of expanded leaves, buds and shoots. Regarding the use of ANA and BAP the combination of 5.37  $\mu\text{M}$  NAA / 4.44  $\mu\text{M}$  BAP showed higher average length of shoots, average number of expanded leaves and buds. For cultivation of mangaba seedling was suitable for use in 4.65  $\mu\text{M}$  KIN in medium, for providing a higher *in vitro* growth of seedlings.

**Key words:** *Hancornia speciosa*, plant hormones, plant development

## 1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma planta tipicamente tropical, frutífera, encontrada naturalmente no Brasil, cuja distribuição ocorre em áreas da caatinga, cerrado, mata atlântica e floresta amazônica. Possui porte médio, podendo atingir até 7 m de comprimento e seus frutos são muito apreciados no nordeste, pelo ótimo aroma, sabor e digestibilidade, podendo ser consumido *in natura* ou processados na forma de sorvete, pudim, geleia, vinho, vinagre, xarope e licor (BARROS et al., 2010; BASTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2010). Sua madeira é utilizada na carpintaria, para confecção de caixas e para produção de carvão, e o látex produzido em todas as partes da planta é utilizado para fins ornamentais (BARROS et al., 2010).

Nas aéreas de tabuleiros e baixadas litorâneas do nordeste, encontra-se quase a totalidade da produção nacional. Os estados da Paraíba, Bahia e Sergipe figuram entre os maiores produtores do país, em que os frutos são obtidos principalmente de forma extrativista (SANTOS et al., 2010). A mangaba possui grande potencial para exploração econômica, porém a falta de informações sobre a cultura vem restringindo seu cultivo comercial. Sua propagação pode ser via assexuada, mediante o uso de parte vegetal e sexuada através da semente, porém têm curta longevidade, sendo necessário ser semeada logo após a extração do fruto. Suas sementes são consideradas recalcitrantes, em que a redução do seu teor de água pode ocasionar danos, prejudicando sua viabilidade e vigor, reduzindo seu poder germinativo (COSTA et al., 2005; SOARES et al., 2009; BARROS et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

A micropropagação é a técnica de maior impacto e de resultados mais concretos dentro da cultura de tecidos, engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da plântula (BASTOS et al., 2007; PINHAL et al., 2011). Com essa técnica são produzidas mudas com características genéticas idênticas às da planta-matriz, permitindo com isso a clonagem de genótipos selecionados e de alta qualidade genética, as mudas obtidas são livres de vírus, uniformes e obtidas em um curto espaço de tempo, otimizando dessa forma a exploração de alguns frutos (LIMA et al., 2007; VILLA et al., 2008; ARRIGONI-BLANK et al., 2011).

Dependendo da espécie cultivada ocorre uma resposta a presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo, a classe, tipo e concentrações utilizadas. A relação entre auxinas e citocininas é essencial para que se alcancem os melhores

resultados na micropropagação, a interação entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese na cultura de tecidos e órgãos (SOARES et al., 2007; PINHAL et al., 2011). As auxinas promovem o alongamento celular e ativação de enzimas hidrolíticas, porém, em altas concentrações podem prejudicar o crescimento da plântula. As citocininas atuam na divisão celular e podem induzir a embriogênese somática (LACERDA et al., 2008; VILLA et al., 2008; REZENDE et al., 2009; WERNER et al., 2010).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar diferentes concentrações e reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de plântulas de mangabeira.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de mangabeira foram coletados em janeiro de 2011, na Fazenda Gameleira, localizada no município de Montes Claros de Goiás – GO (16° 06' 20" S – 51° 17' 11" W) a 592 m de altitude. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IF Goiano - Campus Rio Verde, GO.

A despolpa dos frutos foi realizada manualmente com auxílio de peneira de alumínio malha nº55. Posteriormente, as sementes foram escarificadas manualmente, sob água corrente, para retirada do tegumento e submersas em recipiente com água corrente contendo três gotas de Twenn - 80% durante 30 minutos. Em seguida, foram imersas por 30 segundos em álcool 70% (v/v) e 20 minutos em solução de cloro ativo (5%). O triplo enxague foi feito em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada.

As sementes foram transferidas, uma a uma, para tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 20 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com a metade da concentração original dos sais (MS-50%), mais as vitaminas proposta por White (1943), com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica®). O pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem. Após a transferência, as sementes foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25±3°C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, permanecendo para fornecer explantes já estabelecidos *in vitro*, para implantação dos ensaios.

Os segmentos nodais obtidos foram mantidos *in vitro* por cinco meses, passando por cinco repicagens, sendo cultivados em tubos de ensaio (25 x150 mm) com meio WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980) com a metade da concentração original dos

sais (WPM-50%), mais as vitaminas proposta por White (1943), 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica®). A substituição do meio de cultivo MS-50% pelo WPM-50% foi pelos resultados obtidos no Capítulo I.

### 2.1. Ensaio I – Crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira em função da relação ácido indolacético (AIA) e cinetina (KIN)

Foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais provenientes de sementes preestabelecidas *in vitro*. Cada segmento tinha 2 cm de comprimento e duas gemas axilares.

Os explantes foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150mm), contendo 20 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), com metade da concentração original dos sais (WPM-50%), mais as vitaminas proposta por White (1943) em nove interações (µM) de ácido indolacético (AIA) e cinetina (KIN) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Diferentes combinações de ácido indolacético (AIA) e cinetina (KIN) no crescimento *in vitro* de plântulas mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Rio Verde – GO, 2012.

Tratamentos	AIA (µM)	KIN (µM)
T1	0,00	0,00
T2	0,00	4,65
T3	0,00	9,29
T4	5,71	0,00
T5	5,71	4,65
T6	5,71	9,29
T7	11,42	0,00
T8	11,42	4,65
T9	11,42	9,29

No preparo dos meios, utilizaram 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica®). O pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem. Os tubos inoculados foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25±3°C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Após a avaliação ocorrida aos 30 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico aos que lhes deram origem (1º subcultivo), e conduzidos nas mesmas condições experimentais até a avaliação aos 60 dias. Aos 30 e 60 dias, avaliaram o comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram) da parte aérea, número de gemas, folhas expandidas, brotações laterais, raízes adventícias e calos. Para as características número médio de raízes adventícias e formação de calos por explante foram dadas notas para presença (1) e ausência (0) no momento das avaliações.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x3 (3 concentrações de AIA x 3 concentrações de KIN) e cada tratamento continha 20 repetições, constituída por um tubo, totalizando 180 unidades experimentais. Os dados numéricos foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  e avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2003).

## **2.2. Ensaio II – Crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira em função da relação ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP)**

Utilizou segmentos nodais como fonte de explantes com as mesmas características dos utilizados no ensaio (I), quanto ao comprimento, número de gemas axilares e tempo de cultivo *in vitro*.

Os explantes foram excisados e transferidos para tubos de ensaio (25 x 150mm), contendo 20 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), com metade da concentração original dos sais (WPM-50%), mais as vitaminas proposta por White (1943) em nove combinações ( $\mu\text{M}$ ) de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) (Tabela 2):

**Tabela 2.** Diferentes combinações de naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Rio Verde – GO, 2012.

Tratamentos	ANA ( $\mu\text{M}$ )	BAP ( $\mu\text{M}$ )
T1	0,00	0,00
T2	0,00	4,44
T3	0,00	8,88
T4	5,37	0,00
T5	5,37	4,44
T6	5,37	8,88
T7	10,74	0,00
T8	10,74	4,44
T9	10,74	8,88

Para o preparo dos meios de cultivo utilizaram  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $3,5\text{g L}^{-1}$  de ágar (Dinâmica®). O pH foi ajustado para  $5,7\pm 0,3$  antes da autoclavagem. Após a inoculação os tubos de ensaio foram mantidos nas mesmas condições de crescimento que as descritas no ensaio (I).

Após a avaliação ocorrida aos 30 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo idêntico aos de origem (1º subcultivo), e conduzidos nas mesmas condições experimentais até a avaliação aos 60 dias. Aos 30 e 60 dias, foram avaliadas as mesmas características descritas no ensaio I.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial  $3 \times 3$  (três concentrações de BAP x três concentrações de ANA) e cada tratamento continha 20 repetições, constituída por um tubo, totalizando 180 unidades experimentais. Os dados numéricos foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  e avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Ensaio I – Crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira em função da relação ácido indolacético (AIA) e cinetina (KIN)

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, não houve diferença entre as concentrações de AIA para comprimento médio de parte aérea e formação de calos. Para o número médio de folhas expandidas, foram obtidos os maiores valores na ausência de AIA e na concentração de 11,42  $\mu\text{M}$  AIA, quando na interação com 4,65 e 9,29  $\mu\text{M}$  KIN, respectivamente (Tabela 3). Já para número médio de gemas e brotações laterais foi verificado o mesmo comportamento do número médio de folhas expandidas, ou seja, quando na ausência de AIA em combinação com 4,65  $\mu\text{M}$  KIN obteve o maior valor médio (Tabela 3).

Entre as concentrações de KIN para o comprimento médio de parte aérea e o número médio de gemas quando na combinação de 4,65  $\mu\text{M}$  KIN na ausência de AIA foi constatado os maiores valores médios (Tabela 3). Para o número médio de folhas expandidas na interação 9,29  $\mu\text{M}$  KIN + 11,42  $\mu\text{M}$  AIA foi verificado o maior valor médio. Enquanto para a formação de calos quando na concentração de 4,65  $\mu\text{M}$  KIN na combinação com 11,42  $\mu\text{M}$  AIA foi obtido o maior valor médio (Tabela 3).

Apesar de ter sido observado formação de raízes em alguns tratamentos, não ocorreu diferença entre as concentrações de AIA e KIN.

**Tabela 3.** Comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram), número médio de folhas expandidas, gemas, brotações laterais e formação de calos por plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 30 dias de cultivo em meio WPM-50% suplementado com diferentes combinações de AIA + KIN. Rio Verde – GO, 2012.

Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	KIN		
	0,00	4,65	9,29
AIA	Comprimento médio das plântulas		
0,00	1,76 Aab <sup>1</sup> $\pm$ 0,14 <sup>2</sup>	1,83 Aa $\pm$ 0,17	1,67 Ab $\pm$ 0,11
5,71	1,74 Aa $\pm$ 0,19	1,68 Aa $\pm$ 0,13	1,72 Aa $\pm$ 0,19
11,42	1,70 Aa $\pm$ 0,19	1,68 Aa $\pm$ 0,21	1,79 Aa $\pm$ 0,17
	Número médio de folhas expandidas por plântulas		
0,00	1,35 Aa $\pm$ 0,37	1,63 Aa $\pm$ 0,39	1,35 ABa $\pm$ 0,35
5,71	1,40 Aa $\pm$ 0,37	1,17 Ba $\pm$ 0,24	1,24 Ba $\pm$ 0,43
11,42	1,21 Ab $\pm$ 0,29	1,23 ABb $\pm$ 0,51	1,68 Aa $\pm$ 0,53
	Número médio de gemas por plântulas		
0,00	2,44 Aab $\pm$ 0,37	2,73 Aa $\pm$ 0,43	2,22 Ab $\pm$ 0,50
5,71	2,19 Aa $\pm$ 0,55	2,24 Ba $\pm$ 0,62	2,04 Aa $\pm$ 0,58
11,42	2,23 Aa $\pm$ 0,67	2,10 Ba $\pm$ 0,73	2,45 Aa $\pm$ 0,67
	Número médio de brotações laterais por plântulas		
0,00	1,24 Aa $\pm$ 0,15	1,33 Aa $\pm$ 0,19	1,26 Aa $\pm$ 0,17
5,71	1,09 Aa $\pm$ 0,11	1,18 ABa $\pm$ 0,18	1,19 Aa $\pm$ 0,16
11,42	1,16 Aa $\pm$ 0,16	1,03 Ba $\pm$ 0,08	1,18 Aa $\pm$ 0,21
	Formação de calos por plântulas		
0,00	1,00 Aa $\pm$ 0,00	1,09 Aa $\pm$ 0,12	1,06 Aa $\pm$ 0,10
5,71	1,00 Aa $\pm$ 0,00	1,06 Aa $\pm$ 0,10	1,04 Aa $\pm$ 0,09
11,42	1,00 Ab $\pm$ 0,00	1,17 Aa $\pm$ 0,15	1,00 Ab $\pm$ 0,00

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre as concentrações de AIA na coluna e minúscula entre as concentrações de KIN na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

<sup>2</sup>  $\pm$  Erro padrão da média.

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, o maior número médio de gemas foi observado entre as concentrações de AIA, quando plântulas cultivadas em meio suplementado com 5,71 $\mu\text{M}$  AIA na ausência de KIN, o maior número médio de folhas expandidas ocorreu quando em meio suplementado com 11,42  $\mu\text{M}$  AIA + 9,29  $\mu\text{M}$  KIN. Para brotações, os melhores resultados foram observados na ausência de AIA em combinação com 4,65 $\mu\text{M}$  KIN. Na ausência de AIA em combinação com 4,65  $\mu\text{M}$  ou 9,29  $\mu\text{M}$  KIN e na interação 11,42  $\mu\text{M}$  AIA + 4,65  $\mu\text{M}$  KIN ocorreu maior formação de calos nas plântulas (Tabela 4).

As concentrações de KIN não influenciaram o número médio de folhas expandidas e brotações. Plântulas cultivadas nas concentrações de KIN obtiveram maiores valores para número médio de gemas na interação 9,29  $\mu\text{M}$  KIN + 11,42  $\mu\text{M}$  AIA. Para formação de calos maiores valores foram obtidos nas combinações 4,65 $\mu\text{M}$  KIN + 11,42  $\mu\text{M}$  AIA e 9,29  $\mu\text{M}$  KIN + 0  $\mu\text{M}$  AIA (Tabela 4).

As interações de AIA + KIN não exerceram influência para comprimento médio de parte aérea e número médio de raízes adventícias.

**Tabela 4.** Número médio de folhas expandidas, gemas, brotações e formações de calos por plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo em meio WPM – 50% suplementados com diferentes combinações de AIA + KIN. Rio Verde – GO, 2012.

Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	KIN		
	0,00	4,65	9,29
AIA	Número médio de folhas expandidas por plântula		
0,00	1,69 Aa <sup>1</sup> $\pm$ 0,39 <sup>2</sup>	1,70 Aa $\pm$ 0,34	1,45 ABa $\pm$ 0,45
5,71	1,47 Aa $\pm$ 0,43	1,27 Aa $\pm$ 0,21	1,22 Ba $\pm$ 0,39
11,42	1,45 Aa $\pm$ 0,40	1,39 Aa $\pm$ 0,46	1,71 Aa $\pm$ 0,36
	Número médio de gemas por plântula		
0,00	2,63 ABa $\pm$ 0,49	2,68 Aa $\pm$ 0,55	2,39 Aa $\pm$ 0,65
5,71	2,78 Aa $\pm$ 1,21	2,67 Aa $\pm$ 0,91	2,43 Aa $\pm$ 0,62
11,42	2,02 Bb $\pm$ 0,48	2,60 Aab $\pm$ 1,00	2,72 Aa $\pm$ 1,05
	Formação de calos por plântula		
0,00	1,03 Ab <sup>1</sup> $\pm$ 0,08 <sup>2</sup>	1,13 Aab $\pm$ 0,13	1,18 Aa $\pm$ 0,14
5,71	1,00 Aa $\pm$ 0,00	1,00 Ba $\pm$ 0,00	1,00 Ba $\pm$ 0,00
11,42	1,00 Ab $\pm$ 0,00	1,17 Aa $\pm$ 0,15	1,04 Bb $\pm$ 0,09
	Número médio de brotações laterais por plântula		
0,00	1,27 Aa $\pm$ 0,23	1,33 Aa $\pm$ 0,23	1,20 Aa $\pm$ 0,31
5,71	1,06 Aa $\pm$ 0,25	1,09 Ba $\pm$ 0,12	1,07 Aa $\pm$ 0,27
11,42	1,11 Aa $\pm$ 0,15	1,10 Ba $\pm$ 0,20	1,19 Aa $\pm$ 0,21

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre as concentrações de AIA na coluna e minúscula entre as concentrações de KIN na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

<sup>2</sup>  $\pm$  Erro padrão da média.

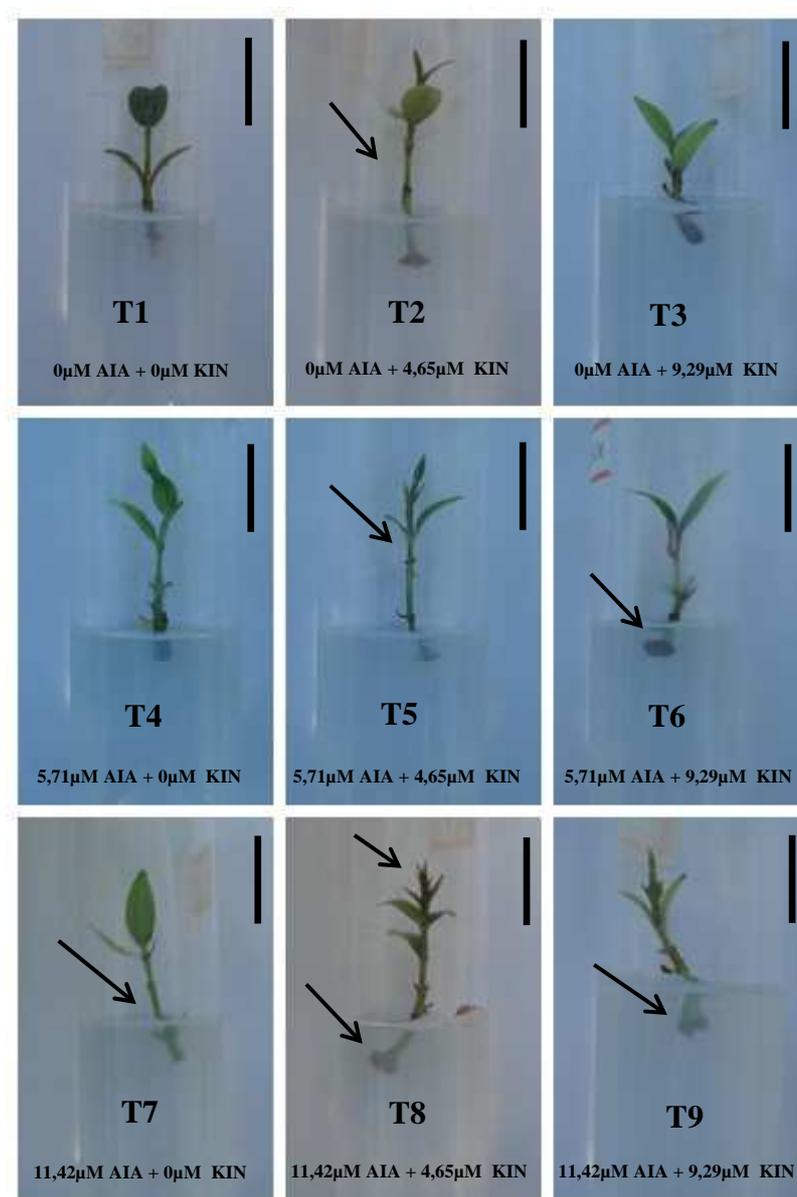
Foi observado que ocorreu regeneração dos segmentos em plântulas vigorosas em todos os tratamentos, avaliados aos 60 dias. Não houve oxidação, porém ocorreu formação de calos, sendo observada baixa contaminação bacteriana (10,56%) e nenhuma fúngica.

Visualmente, aos 60 dias de cultivo, nos tratamentos com as interações 0 $\mu\text{M}$  AIA + 0  $\mu\text{M}$  KIN, 5,71  $\mu\text{M}$  AIA + 0  $\mu\text{M}$  KIN, 5,71  $\mu\text{M}$  AIA + 9,29  $\mu\text{M}$  KIN e 11,42  $\mu\text{M}$  AIA + 4,65  $\mu\text{M}$  KIN as plântulas obtidas eram vigorosas de coloração verde - escura, sem alterações morfológicas sendo rígidas ao serem excisadas. No restante dos tratamentos predominou a coloração verde-clara nas plântulas (Figura 1).

Nas interações 5,71  $\mu\text{M}$  AIA + 4,65  $\mu\text{M}$  KIN, 11,42  $\mu\text{M}$  AIA + 4,65  $\mu\text{M}$  KIN e 11,42  $\mu\text{M}$  AIA + 9,29  $\mu\text{M}$  KIN as folhas obtidas eram rudimentares embora

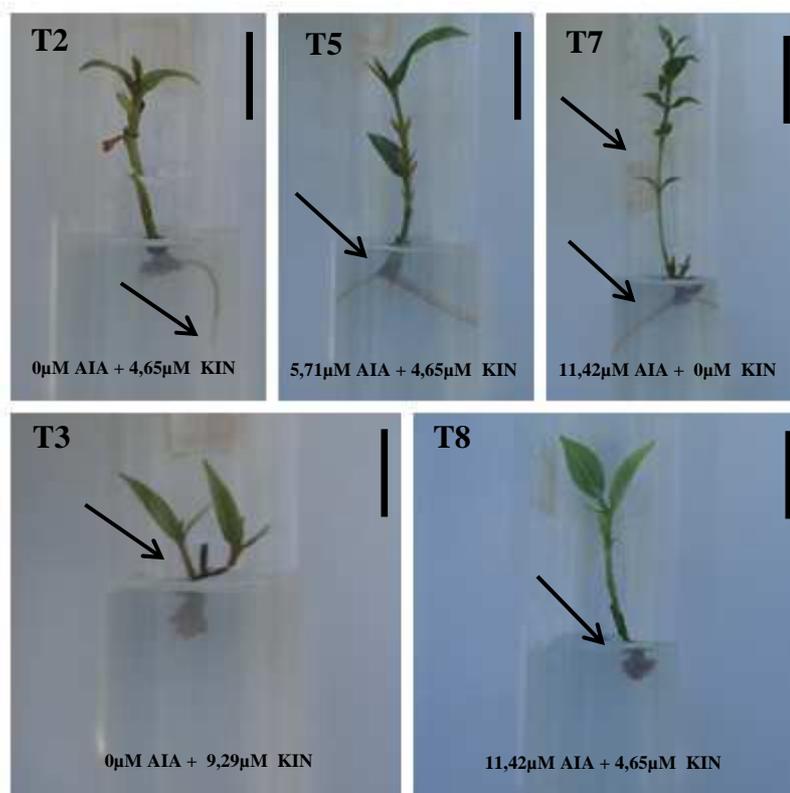
estivessem expandidas e os entrenós das plântulas eram curtos, diferindo das outras interações e ocorreu início de formação de calos (Figura 1 e 2).

As plântulas cultivadas nas interações 0  $\mu\text{M}$  AIA + 4,65  $\mu\text{M}$  KIN, 5,71  $\mu\text{M}$  AIA + 4,65  $\mu\text{M}$  KIN e 11,42  $\mu\text{M}$  AIA + 0  $\mu\text{M}$  KIN eram estioladas, e o caule e as folhas despigmentados (verde-claro) (Figura 1 e 2).



**Figura 1.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM – 50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T1) 0 AIA + 0 KIN; (T2) 0 AIA + 4,65 KIN; (T3) 0 AIA + 9,29 KIN; (T4) 5,71 AIA + 0 KIN; (T5) 5,71 AIA + 4,65 KIN; (T6) 5,71 AIA + 9,29 KIN; (T7) 11,42 AIA + 0 KIN; (T8) 11,42 AIA + 4,65 KIN; (T9) 11,42 AIA + 9,29 KIN. Plântulas estioladas, formação de calos e entrenós curtos (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

Ocorreu formação de raízes adventícias nas interações 0  $\mu\text{M}$  AIA + 4,65  $\mu\text{M}$  KIN, 5,71  $\mu\text{M}$  AIA + 4,65  $\mu\text{M}$  KIN e 11,42  $\mu\text{M}$  AIA + 0  $\mu\text{M}$  KIN e brotações laterais na combinação 0  $\mu\text{M}$  AIA + 9,29  $\mu\text{M}$  KIN (Figura 2).



**Figura 2.** Plântulas de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM – 50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T2) 0 AIA + 4,65 KIN; (T3) 0 AIA + 9,29 KIN; (T5) 5,71 AIA + 4,65 KIN; (T7) 11,42 AIA + 0 KIN; (T8) 11,42 AIA + 4,65 KIN. Raízes adventícias, brotações laterais, plântula estiolada e formação de calos (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

Em estudos realizados com mussaenda (*Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea) Almeida et al. (2010) encontraram resultados semelhantes aos descritos neste trabalho, em que meio de cultivo suplementado com 1  $\text{mg L}^{-1}$  (4,65  $\mu\text{M}$ ) de KIN promoveu maior multiplicação de gemas. Enquanto para barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.) concentrações de 1  $\text{mg L}^{-1}$  (4,65  $\mu\text{M}$ ) e 5  $\text{mg L}^{-1}$  (23,23  $\mu\text{M}$ ) de KIN foram as mais eficientes para indução de gemas e brotações (NICIOLI et al., 2008).

Perante os resultados obtidos o uso de meio de cultivo suplementado com 4,65  $\mu\text{M}$  KIN ausente de AIA foi o mais adequado para o crescimento *in vitro* de mangaba,

por proporcionar maior comprimento médio dos explantes, número de folhas expandidas, gemas e brotações laterais.

### **3.2. Ensaio II – Crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira em função da relação ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP)**

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, entre as concentrações de ANA, plântulas cultivadas na interação 5,37  $\mu\text{M}$  ANA + 4,44  $\mu\text{M}$  BAP obtiveram maior comprimento médio e número médio de gemas. Para número médio de folhas expandidas foi observado o mesmo comportamento de comprimento médio de parte aérea e número médio de gemas. A combinação 0  $\mu\text{M}$  ANA + 4,44  $\mu\text{M}$  BAP também proporcionou elevados valores médios para folhas expandidas. Para formação de calos não foi observado influência das concentrações de ANA (Tabela 5).

Entre as concentrações de BAP, para número médio de folhas expandidas e formação de calos foi observado que na ausência de BAP, independente da concentração de ANA utilizada, obtiveram os menores valores médios. Na ausência de BAP, em combinação com 5,37  $\mu\text{M}$  ANA, foram observados os menores valores para comprimento médio de parte aérea, porém a interação 8,88  $\mu\text{M}$  BAP + 0  $\mu\text{M}$  ANA e 8,88  $\mu\text{M}$  BAP + 10,74  $\mu\text{M}$  ANA proporcionou maior número médio de gemas (Tabela 5). As diferentes concentrações de ANA e BAP não exerceram influência para número médio de brotações.

**Tabela 5.** Comprimento médio de plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram), número médio de folhas expandidas, gemas e formação de calos por plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 30 dias de cultivo em meio WPM – 50% suplementado com diferentes concentrações de ANA + BAP. Rio Verde – GO, 2012.

Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	BAP		
	0	4,44	8,88
ANA	Comprimento médio das plântulas		
0,00	1,72 Aa <sup>1</sup> $\pm$ 0,14 <sup>2</sup>	1,86 ABa $\pm$ 0,27	1,90 Aa $\pm$ 0,24
5,37	1,66 Ab $\pm$ 0,14	1,99 Aa $\pm$ 0,53	1,92 Aa $\pm$ 0,37
10,74	1,77 Aa $\pm$ 0,32	1,69 Ba $\pm$ 0,15	1,78 Aa $\pm$ 0,21
	Número médio de folhas expandidas por plântulas		
0,00	1,28 Ab $\pm$ 0,23	2,02 Aa $\pm$ 0,61	1,89 Aa $\pm$ 0,60
5,37	1,31 Ab $\pm$ 0,26	1,93 Aa $\pm$ 1,22	2,06 Aa $\pm$ 0,63
10,74	1,26 Ab $\pm$ 0,26	1,20 Bb $\pm$ 0,40	1,77 Aa $\pm$ 0,49
	Número médio de gemas por plântulas		
0,00	2,35 Ab $\pm$ 0,40	2,50 ABab $\pm$ 0,70	2,78 Aa $\pm$ 0,55
5,37	2,35 Aa $\pm$ 0,60	2,55 Aa $\pm$ 0,96	2,69 Aa $\pm$ 0,75
10,74	2,30 Aab $\pm$ 0,51	2,07 Bb $\pm$ 0,78	2,55 Aa $\pm$ 0,57
	Formação de calos por plântulas		
0,00	1,00 Ab $\pm$ 0,00	1,31 Aa $\pm$ 0,13	1,19 Aa $\pm$ 0,14
5,37	1,00 Ab $\pm$ 0,00	1,36 Aa $\pm$ 0,12	1,27 Aa $\pm$ 0,13
10,74	1,00 Ab $\pm$ 0,00	1,22 Aa $\pm$ 0,14	1,30 Aa $\pm$ 0,12

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre as concentrações de NAA na coluna e minúscula entre as concentrações de BAP na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

<sup>2</sup>  $\pm$  Erro padrão da média.

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, entre as concentrações de ANA maiores número médio de folhas expandidas foram verificadas na ausência de ANA em combinação com 4,44 ou 8,88  $\mu\text{M}$  BAP. Para formação de calos não houve diferença entre as concentrações. Entre as concentrações de BAP, as concentrações 4,44 ou 8,88 $\mu\text{M}$  BAP na ausência ou na interação 8,88  $\mu\text{M}$  BAP + 10,74  $\mu\text{M}$  ANA possibilitou os mais elevados números médios de folhas expandidas. Nas relações 4,44  $\mu\text{M}$  BAP + 0  $\mu\text{M}$  ANA e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP + 5,37  $\mu\text{M}$  ANA foram obtidos os maiores valores para formação de calos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Número médio de folhas expandidas e formação de calo por explante em plântulas de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo em meio WPM -50% suplementado com diferentes concentrações de ANA + BAP. Rio Verde – GO, 2012.

Concentrações ( $\mu\text{M}$ )	BAP		
	0,00	4,44	8,88
ANA	Número médio de folhas expandidas por plântulas		
0,00	1,58 Ab <sup>1</sup> $\pm$ 0,59 <sup>2</sup>	2,24 Aa $\pm$ 0,63	2,24 Aa $\pm$ 0,75
5,37	1,42 Aa $\pm$ 0,40	1,83 ABa $\pm$ 1,31	1,89 Aa $\pm$ 0,93
10,74	1,30 Ab $\pm$ 0,61	1,46 Bab $\pm$ 0,35	1,88 Aa $\pm$ 0,59
	Formação de calos por plântulas		
0,00	1,00 Ab <sup>1</sup> $\pm$ 0,00 <sup>2</sup>	1,28 Aa $\pm$ 0,14	1,19 Aab $\pm$ 0,14
5,37	1,04 Ab $\pm$ 0,09	1,26 Aa $\pm$ 0,18	1,24 Aab $\pm$ 0,14
10,74	1,16 Aa $\pm$ 0,31	1,29 Aa $\pm$ 0,13	1,30 Aa $\pm$ 0,12

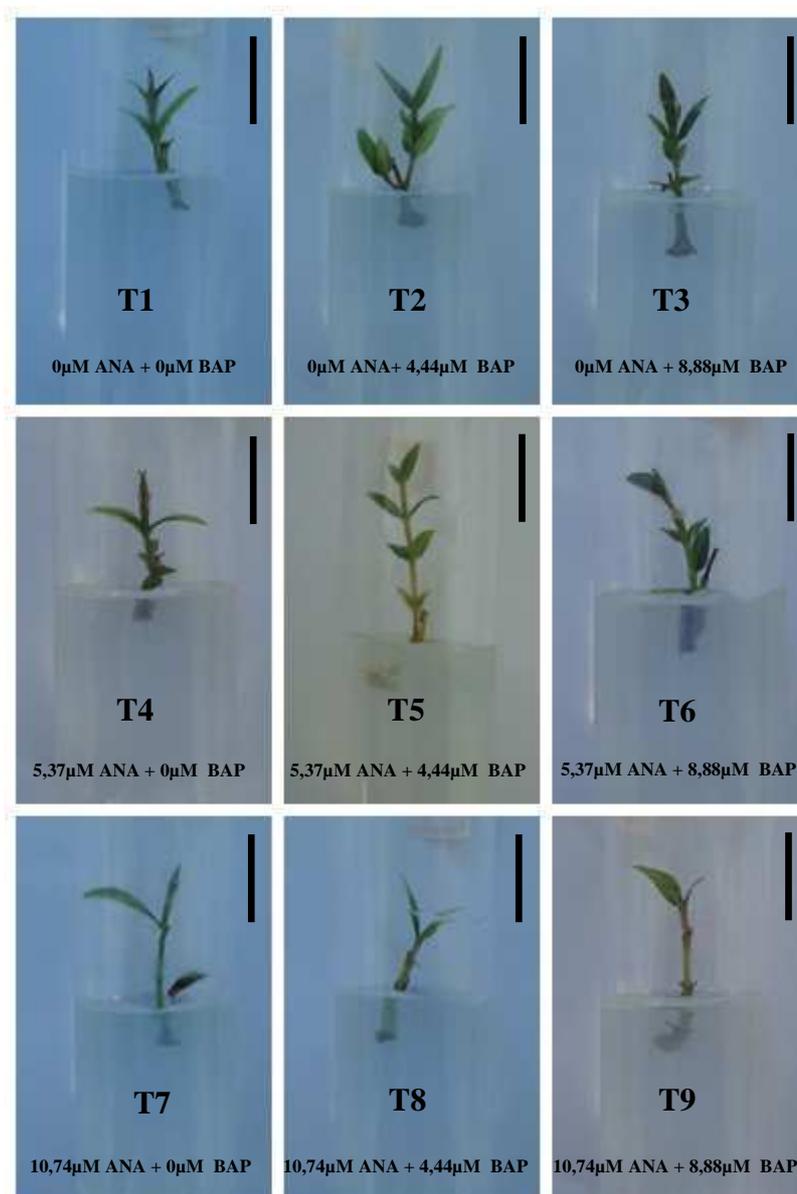
<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre as concentrações de ANA na coluna e minúscula entre as concentrações de BAP na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

<sup>2</sup>  $\pm$  Erro padrão da média.

Visualmente constataram que os segmentos nodais em todos os tratamentos regeneraram plântulas bem formadas aos 60 dias. Não ocorreu oxidação, porém houve formação de calos. Foi observada baixa contaminação bacteriana (7,78%) e nenhuma fúngica.

Na ausência de regulador de crescimento no meio de cultivo, nas concentrações 5,37  $\mu\text{M}$  ANA e 10,47  $\mu\text{M}$  ANA em ausência de BAP ou na interação 10,47  $\mu\text{M}$  ANA + 4,44  $\mu\text{M}$  BAP as plântulas obtidas eram de coloração verde-escura, com folhas expandidas pequenas e entrenós curtos (Figura 3). Porém as plântulas cultivadas nas combinações de 0  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP e 5,37  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP eram de coloração verde-escura mais acentuada, característico da espécie, com folhas expandidas e maiores (Figura 3 e 4).

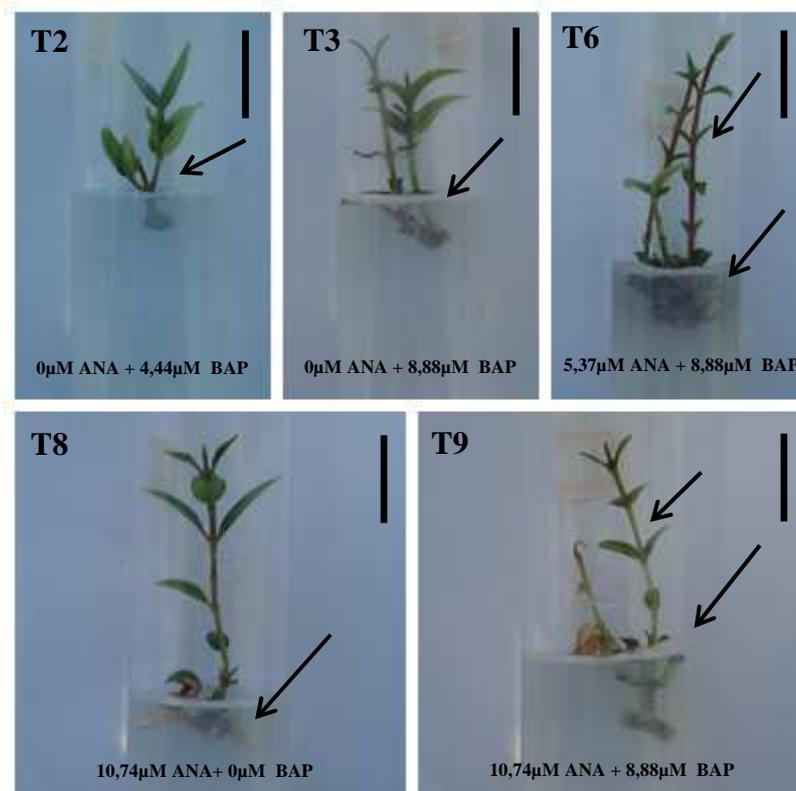
Nas interações 0  $\mu\text{M}$  ANA + 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, 5,37  $\mu\text{M}$  ANA + 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 10,74  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP as plântulas eram de coloração verde-clara, sendo que nas duas últimas combinações o caule das plântulas era totalmente despigmentado (branco). As folhas expandidas das duas primeiras interações eram maiores e na última as folhas apesar de expandidas eram menores (Figura 3 e 4).



**Figura 3.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T1) 0 ANA+ 0 BAP; (T2) 0 ANA+ 4,44 BAP; (T3) 0 ANA + 8,88 BAP; (T4) 5,37 ANA+ 0 BAP; (T5) 5,37 ANA + 4,44 BAP; (T6) 5,37 ANA + 8,88 BAP; (T7) 10,74 ANA + 0 BAP; (T8) 10,74 ANA + 4,44 BAP; (T9) 10,74 ANA + 8,88 BAP. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra = 10mm.

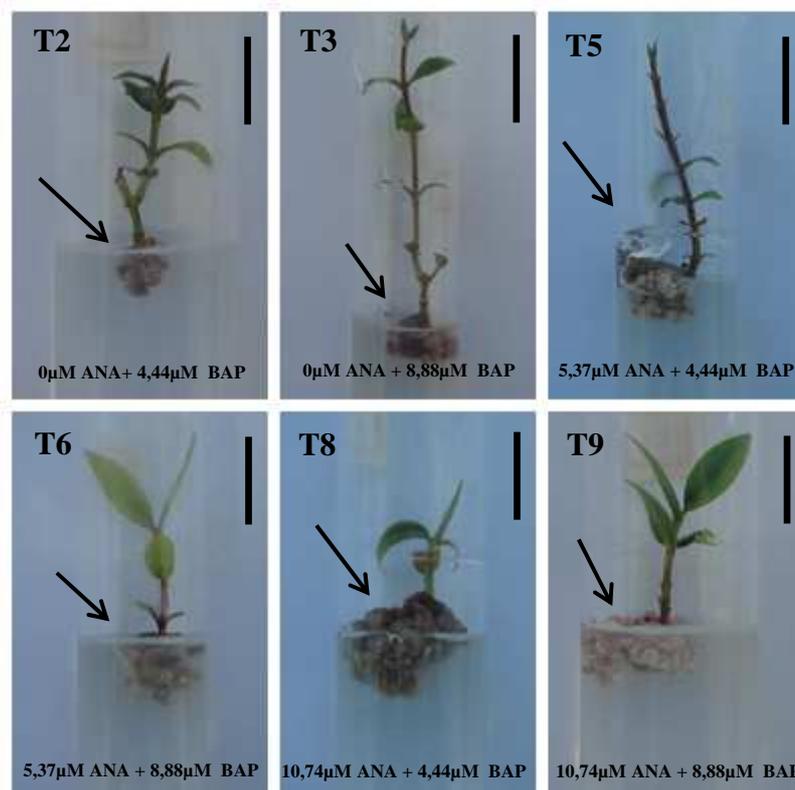
Na interação 5,37  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP o caule de algumas brotações laterais exibiram coloração roxo-avermelhado, que é característico da espécie, fato também observado por Lédo et al. (2007). Outras brotações laterais eram de coloração verde-clara com aspecto estiolado, como nas obtidas nas interações 0  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP e 10,74  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP (Figura 4).

Ocorreu formação de calos e raízes adventícias na interação 5,37  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP e em meio suplementado com 10,74  $\mu\text{M}$  ANA ausente de BAP, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T2) 0 ANA + 4,44 BAP; (T3) 0 ANA + 8,88 BAP; (T6) 5,37 ANA + 8,88 BAP; (T7) 10,74 ANA + 0 BAP; (T9) 10,74 ANA + 8,88 BAP. Brotações laterais, coloração roxo-avermelhada, calos, raízes adventícias e plântula estiolada (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra = 10mm.

A formação de calos ocorreu em diversas interações ANA + BAP, diferindo quanto ao tamanho e coloração da massa formada, todos eram de consistência rígida e dura (calos compacto) (Figura 5). Quanto à coloração dos calos na ausência de ANA em meio suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  BAP ou 8,88  $\mu\text{M}$  BAP, e na interação 10,74  $\mu\text{M}$  ANA + 4,44  $\mu\text{M}$  BAP eram de coloração escura (marrom). Os calos obtidos na interação 10,74  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP eram brancos com algumas pontuações vermelhas, enquanto os obtidos nas combinações 5,37  $\mu\text{M}$  ANA + 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 5,37  $\mu\text{M}$  ANA + 8,88  $\mu\text{M}$  BAP eram brancos com pontuações escuras (marrom) (Figura 5).



**Figura 5.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50%. Tratamentos ( $\mu\text{M}$ ): (T2) 0 ANA + 4,44 BAP; (T3) 0 ANA + 8,88 BAP; (T5) 5,37 ANA + 4,44 BAP; (T6) 5,37 ANA + 8,88 BAP; (T8) 10,74 ANA + 4,44 BAP; (T9) 10,74 ANA + 8,88 BAP. Formação de calos (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra= 10mm.

As diferentes concentrações de ANA e BAP influenciaram o comprimento médio de parte aérea, número médio de gemas, raízes adventícias. Apesar de ter observado a formação de brotações laterais em algumas interações, não ocorreu diferença entre as concentrações utilizadas. Diferente do encontrado no presente trabalho, Bastos et al. (2007), utilizando meio de cultivo suplementado com  $2 \text{ mg L}^{-1}$  ( $8,88 \mu\text{M}$ ) BAP e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $2,85 \mu\text{M}$ ) AIA, relataram maior formação de brotações em mangaba. Soares et al. (2007) obtiveram maior número de brotações e gemas em mangaba quando utilizaram  $5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $22,20 \mu\text{M}$ ) e  $3 \text{ mg L}^{-1}$  ( $13,32 \mu\text{M}$ ) de BAP em meio WPM, sendo que o maior comprimento de brotações ocorreu em meio suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ( $4,44 \mu\text{M}$ ) ou  $2 \text{ mg L}^{-1}$  ( $8,88 \mu\text{M}$ ) de BAP.

De acordo com Santos et al. (2008) para formação de brotações em abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus* Lindl.), a concentração de  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  ( $5,33 \mu\text{M}$ ) de BAP com 120 dias de cultivo *in vitro* foi a mais eficiente.

Araujo et al. (2008), porém observaram que o meio suplementado com 2,243 mg L<sup>-1</sup> (9,96 µM) de BAP promoveu maior proliferação de brotos em abacaxizeiro “smooth cayenne”, sendo que quando utilizado 1 mg L<sup>-1</sup> (4,44 µM) de BAP, os brotos eram mais desenvolvidos. Aragão et al. (2011) verificaram que a concentração de 2,5 µM de BAP foi a mais indicada para induzir brotações em pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). Santos et al. (2006), utilizando 0,05 mg L<sup>-1</sup> (0,27 µM) de ANA combinado com 0,75 mg L<sup>-1</sup> (3,33 µM) de BAP, encontraram maior indução de brotações e de gemas em pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)

Segundo Villa et al. (2008), maior comprimento médio de parte aérea de amoreira-preta cv. Brazos (*Rubus* spp.) ocorreu em meio de cultivo suplementado com 1mg L<sup>-1</sup> (5,37 µM) de ANA. Para a *Cattleya loddigesii* sp. na concentração de 0,67 mg L<sup>-1</sup> (3,60 µM) de ANA é obtido maior número de folhas (REZENDE et al., 2009). Em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart.) para indução de raízes e obtenção de maior comprimento destas a concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> (21,48 µM) de ANA foi a mais eficiente (NICIOLI et al., 2008). Porém, para o enraizamento de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) meio suplementado com 3 mg L<sup>-1</sup> (16,11µM) de ANA foi o mais eficiente (JARDIM et al., 2010). Enquanto para guarirrobeira (*Syagrus oleracea* Mart.) meio contendo 1 mg L<sup>-1</sup> (5,37 µM) de ANA foi o mais adequado para formação de raízes (MELO et al., 2001). Para a micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy e Ébano melhores resultados foram obtidos com a adição de 1 mg L<sup>-1</sup> (5,37 µM) de ANA no meio de cultivo (VILLA et a., 2008). Para a multiplicação de abacaxizeiro cv. Emepa *in vitro* meio MS suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> (8,88 µM) de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> (2,68 µM) de ANA foi o mais adequado (MORAES et al., 2010). Costa et al. (2010) observaram melhor multiplicação de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em meio suplementado com 17,76 µM de BAP.

Portanto, com os resultados obtidos verificando que meio de cultivo suplementado com 5,37 µM ANA + 4,44 µM BAP foi o mais adequado para o crescimento *in vitro* de mangabeira, proporcionou maior comprimento médio de parte aérea, número de folhas expandidas e gemas. Sendo que meio em ausência de ANA suplementado com 4,44 µM BAP também pode ser usado, porém esse proporciona menor comprimento médio dos explantes.

Meio de cultivo suplementado com 4,65 µM KIN em ausência de AIA proporcionou maior comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas expandidas, gemas e brotações em mangabeira e formação de raízes adventícias, apesar

de não ter ocorrido diferença entre as concentrações de AIA + KIN, e nessa concentração ocorreu formação de calos.

Desta forma, para o cultivo *in vitro* de plântulas de mangabeira o mais adequado foi a utilização de 4,65  $\mu\text{M}$  KIN em meio, proporcionando brotações e menor massa de calos, além de ter ocorrido formação de raízes adventícias, e formação de menor massa de calos.

#### 4. CONCLUSÃO

A concentração de 4,65  $\mu\text{M}$  KIN em ausência de AIA propicia maior comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas expandidas, gemas e brotações.

Na interação 5,37  $\mu\text{M}$  NAA + 4,44  $\mu\text{M}$  BAP ocorreu maior comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas expandidas e gemas de plântulas de mangabeira.

Para o cultivo de plântulas de mangabeira foi adequado a utilização de 4,65  $\mu\text{M}$  KIN em meio, proporcionando maior crescimento *in vitro* das plântulas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. L.; DINIZ, J. D. N.; OLIVEIRA, A. B. de; HERNANDEZ, F. F. F. Propagação *in vitro* de mussaenda (*Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 2, p. 206-212, 2010.

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. do A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de Pau-Brasil. **Cerne**, v. 17, n. 3, p. 339-345, 2011.

ARAÚJO, R. F.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro “smooth cayenne” utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). **Ceres**, v. 55, n. 5, p. 455-460, 2008.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; ALMEIDA, S. A.; OLIVEIRA, A. C. L.; BLANK, A. F. Micropropagação e aclimatização de gerânio (*Pelargonium graveolens* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 271-275, 2011.

BARROS, D. I.; BRUNO, R de L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação. **Revista Acta Tecnológica**, v. 5, n. 1, p. 31-43, 2010.

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

COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.

COSTA, G. M. da; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. de. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p.1090-1096, 2010.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - versão 4,3. DEX/UFLA - Lavras, MG, 2003.

JARDIM, L. S.; SAMPAIO, P. de T. B.; COSTA, S. de S.; GONÇALVES, C. de Q. B.; BRANDÃO, H. L. M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010.

LACERDA, G. A.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; PAIVA, L. V.; MELO, E. F.; OLIVEIRA, A. C. S. de; REZENDE, J. C. de. Influência de reguladores de crescimento no desenvolvimento radicular de sementes de *Coffea arábica* L. "Rubi" *in vitro*. **Coffee Science**, v. 3, n. 1, p. 81-84, 2008.

LÉDO, A. da S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; BENITEZ, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 669-671, 2007.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

MELO, B. de; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirôbeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, v. 17, n. 1, p. 49-59, 2001.

MORAES, A. M. de; ALMEIDA, F. de A. C.; BRUNO, R. de L. A.; CAZÉ FILHO, J.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e ambiental**, v. 14, n. 9, p. 932-936, 2010.

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

NICIOLI, P. M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SANTANA, J. R. F. de; SILVA, L. C.; SILVA, D. P. C. da; PORTO, J. M. P. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 685-689, 2008.

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

REZENDE, J. C. de; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; SANTOS, F. C. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* sp.: adição de reguladores de crescimento e sacarose. **Agrarian**, v. 2, n. 3, p. 99-114, 2009.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de; SILVA, D. P. C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SANTOS, M. do D. M.; RIBEIRO, D. G.; TORRES, A. C. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1115-1120, 2008.

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

SOARES, F. P.; PAIVA, P.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a geminação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A. de; PIO, L. A. S.; ASSIS, G. A. de. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1754-1759, 2008.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v. 7, p. 53-65, 1943.

## CAPÍTULO V

### DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO PARA ENRAIZAMENTO DE EXPLANTES DE MANGABEIRA *IN VITRO*

#### RESUMO

A mangabeira tem grande potencial para exploração econômica, destacada como uma das árvores frutíferas mais promissoras para programas de exploração sustentável no cerrado, porém sua propagação sexuada não é satisfatória pelo elevado grau de recalcitrância de suas sementes, sendo necessário semear logo após a extração do fruto. Algumas espécies têm dificuldades na fase de enraizamento *in vitro*, com destaque para as lenhosas, sendo necessária a adição de reguladores de crescimento ou modificações na constituição do meio de cultivo. Objetivou-se com esse trabalho, avaliar o efeito da sacarose e carvão ativo, em combinação com diferentes concentrações de ácido indolbutírico, no enraizamento *in vitro* de mangabeira. Foram avaliados quatro diferentes composições de meio de cultivo que diferenciavam na presença e ausência de sacarose e carvão ativado em combinação com cinco diferentes concentrações ( $\mu\text{M}$ ) de ácido indolbutírico (AIB) (0,0; 12,3; 24,6; 36,9; 49,2  $\mu\text{M}$ ). Foi utilizado delineamento inteiramente ao acaso. Após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados comprimento médio da parte aérea, número médio de gemas, folhas expandidas, brotações, porcentagem de enraizamento, comprimento médio de raízes e porcentagem de formação de calos. Conclui-se que o meio de cultivo com sacarose e sem carvão ativado suplementado com 36,9 $\mu\text{M}$  de AIB proporcionou maior crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de mangaba.

**Palavra – chaves:** *Hancornia speciosa* Gomes, ácido indolbutírico, sacarose, carvão.

## CHAPTER V

### DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR EXPLANTS ROOTING OF MANGABEIRA *IN VITRO*

#### ABSTRACT

Mangabeira has great potential for economic exploitation, especially as one of the most promising fruit trees for sustainable programs in the cerrado, but its sexual propagation is not satisfactory for the high degree of recalcitrance of their seeds, being necessary to seed immediately after fruit removal. Some species have difficulties in the *in vitro* rooting phase, with emphasis to the woody, being necessary the addition of growth regulators or changes in the constitution of the medium. The objective of this study was to evaluate the effect of sucrose and activated charcoal in combination with different concentrations of IBA on *in vitro* rooting of *H. speciosa*. There were evaluated four different compositions of growth media that differed in the presence and absence of sucrose and activated charcoal in combination with five different concentrations of ( $\mu\text{M}$ ) INDOLBUTYRIC ACID (IBA) (0.0, 12.3, 24.6, 36.9, 49.2  $\mu\text{M}$ ). There were used a completely randomized design. After 30 and 60 days of *in vitro* culture, were evaluated the average length of shoots, average number of buds, expanded leaves, shoots, rooting percentage, average length of roots and percentage of callus formation. It is concluded that the culture medium with sucrose and without activated charcoal supplemented with 36.9  $\mu\text{M}$  IBA showed higher growth and rooting of *in vitro* mangaba explants.

**Key words:** *Hancornia speciosa*, IBA, sucrose, coal

## 1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) tem grande potencial para exploração econômica, destacada como uma das árvores frutíferas mais promissoras para programas de exploração sustentável no cerrado, apesar dos poucos estudos sobre a cultura sua propagação pode ser via assexuada, mediante o uso de parte vegetal e sexuada através da semente, porém não é satisfatória pelo elevado grau de recalcitrância de suas sementes, sendo necessário semear logo após a extração do fruto. A redução do teor de água de suas sementes pode ocasionar danos, prejudicando sua viabilidade e vigor, e com isso reduzindo o poder germinativo, e a polpa dos frutos tem ação inibitória sobre a germinação (BASTOS et al., 2007; CALDAS et al., 2009; SOARES et al., 2009; SANTOS et al., 2010; BARROS et al., 2010;).

A sua exploração é predominantemente extrativista. Sua madeira é utilizada na carpintaria, para confecção de caixas e para produção de carvão. A planta é laticífera e a borracha tem potencial de uso industrial, as características físico-mecânicas conferem à borracha boas características tecnológicas, podendo ser usada em aplicações comerciais (VIEIRA et al., 2006; SOARES et al., 2007; BARROS et al., 2010). Seus frutos do tipo baga contêm polpa branca, agridoce e aromática, sendo 80% da polpa aproveitada na forma de sucos, sorvetes, licores, doces, vinho e vinagre ou consumida *in natura* (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2009).

O crescimento das mudas é lento, reduzido o interesse em propagá-la, por isso a micropropagação é a alternativa mais utilizada com a finalidade de obter um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano, sendo importante na propagação de diferentes espécies, que assim como a mangabeira tem baixa taxa de germinação (LÉDO et al., 2007; SOARES et al., 2007; CALDAS et al., 2009).

Algumas espécies, com destaque para as lenhosas têm dificuldades na fase de enraizamento, mesmo na presença de auxinas no meio de cultivo não enraízam. Já algumas espécies dispensam o uso de reguladores de crescimento para o enraizamento (SOARES et al., 2007).

Na fase de enraizamento, para indução de raízes adventícias em espécies lenhosas, é comum à adição no meio de cultivo de auxinas exógenas, que são os únicos reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares, por exemplo, o ácido indolbutírico (IBA). O uso de reguladores de crescimento aumenta a velocidade de formação de raízes e uniformidade do enraizamento, principalmente em

plantas em que este processo é mais difícil de ocorrer (NASCIMENTO et al., 2008; KRATZ et al., 2011;). Entretanto quando a concentração de auxina no meio de cultivo é excessiva, ocorre formação de calos na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea (RADMANN et al., 2002; LEITZKE et al., 2009).

O enraizamento *in vitro* também é influenciado pelas modificações na constituição do meio de cultivo, a maioria das espécies formam raízes com adição de 20-30g L<sup>-1</sup> de sacarose, por causa da baixa capacidade fotossintética das plantas cultivadas *in vitro*, essas requerem a adição de carboidratos para suprir suas necessidades metabólicas. O aumento da concentração de sacarose estimula o crescimento e formação de raízes de algumas espécies *in vitro*, já a redução dessa concentração na fase de enraizamento beneficia a qualidade do sistema radicular, além de aumentar a taxa de sobrevivência das plântulas transplantadas (CALVETE et al., 2002; SKREBSKY et al., 2004).

Já a adição de carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% no meio de cultivo pode ser benéfica, ele simula a condição de ausência de luminosidade, onde as raízes normalmente se desenvolvem, com a redução da incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicular, além de adsorver substâncias tóxicas, principalmente fenóis e/ou quinonas que podem afetar o desenvolvimento do explante (LÉDO et al., 2007).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito da sacarose e carvão ativo, em combinação com diferentes concentrações de ácido indolbutírico, no enraizamento *in vitro* de mangabeira.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O material vegetal utilizado na propagação *in vitro* foi retirado de frutos de mangabeira coletados em janeiro de 2011, na Fazenda Gameleira, localizada no município de Montes Claros de Goiás – GO (16° 06' 20'' S – 51° 17' 11'' W) a 592m de altitude. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IF Goiano - Campus Rio Verde, GO.

Foram utilizados como fonte de explantes, segmentos nodais provenientes de sementes preestabelecidas *in vitro*, conforme já descrito. Cada segmento tinha 2cm de comprimento e duas gemas axilares. Os explantes foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 20 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD &

MCCOWN, 1980), com a metade da concentração de sais (WPM – 50%), mais as vitaminas proposta por White (1943).

Foram avaliadas quatro diferentes composições de meio de cultivo que diferenciavam na presença e ausência de sacarose e carvão ativado em combinação com cinco diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) ( $\mu\text{M}$ ) (0,0; 12,3; 24,6; 36,9; 49,2) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Diferentes combinações de ácido indolbutírico (AIB), sacarose e carvão ativado no cultivo *in vitro* em meio WPM – 50% de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Rio Verde- GO, 2012.

Tratamentos	AIB ( $\mu\text{M}$ )	Sacarose	Carvão ativado
T1	0,0	presença	presença
T2	12,3	presença	presença
T3	24,6	presença	presença
T4	36,9	presença	presença
T5	49,2	presença	presença
T6	0,0	presença	ausência
T7	12,3	presença	ausência
T8	24,6	presença	ausência
T9	36,9	presença	ausência
T10	49,2	presença	ausência
T11	0,0	ausência	presença
T12	12,3	ausência	presença
T13	24,6	ausência	presença
T14	36,9	ausência	presença
T15	49,2	ausência	presença
T16	0,0	ausência	ausência
T17	12,3	ausência	ausência
T18	24,6	ausência	ausência
T19	36,9	ausência	ausência
T20	49,2	ausência	ausência

No preparo dos meios de cultivo em que ocorreram a presença de sacarose e carvão ativado utilizaram  $30 \text{ g L}^{-1}$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente, e  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar (Dinâmica<sup>®</sup>), o pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,3$  antes da autoclavagem. Os tubos

inoculados foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de  $45\text{-}55\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ .

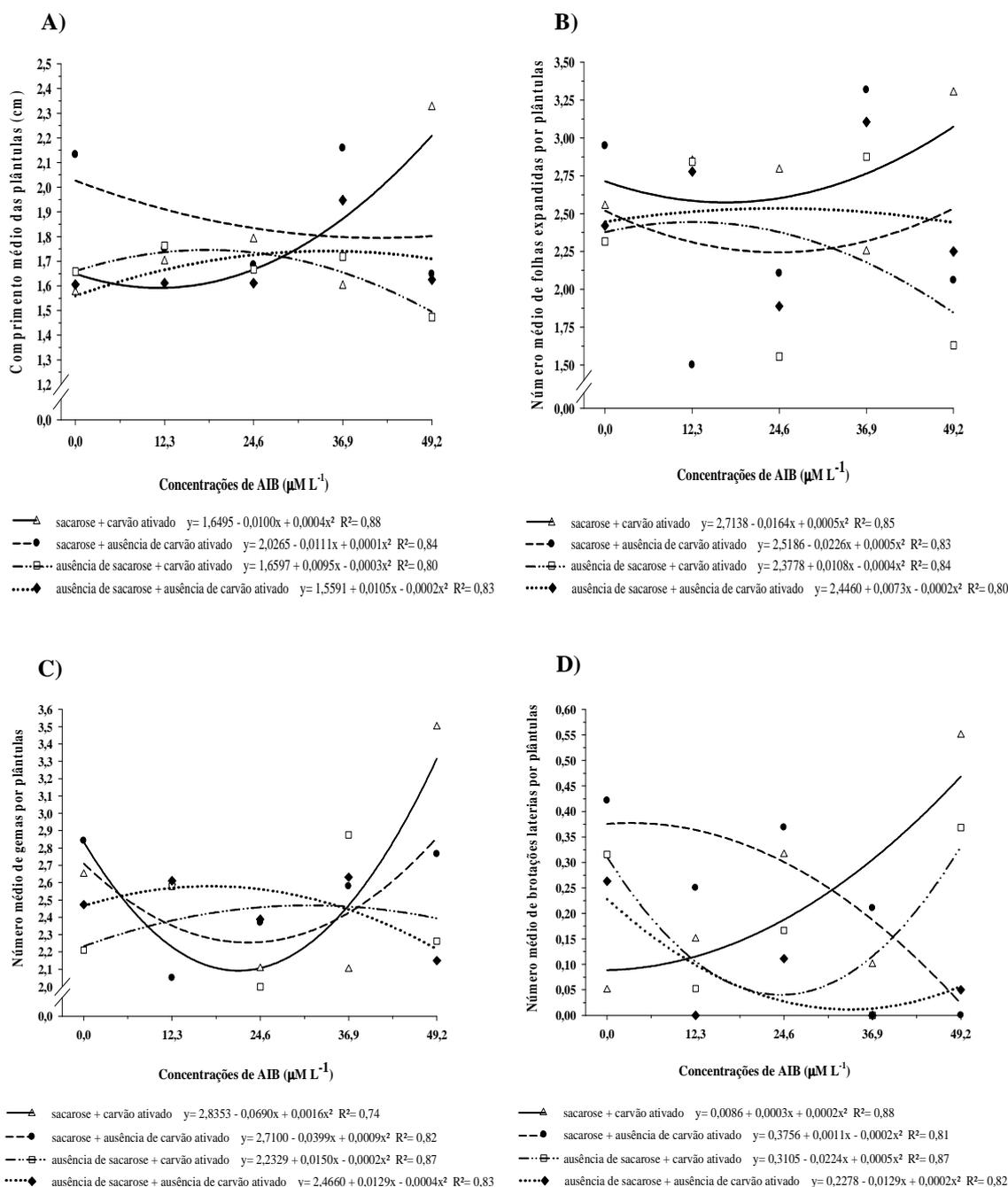
Após a avaliação aos 30 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo idêntico aos que lhes deram origem (1º subcultivo), e conduzidos nas mesmas condições experimentais até a avaliação aos 60 dias. Aos 30 e 60 dias, avaliaram o comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (cm), número médio de gemas, folhas expandidas, brotações laterais, porcentagem de enraizamento, comprimento médio de raízes adventícias e porcentagem de formação de calos.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial  $4\times 5$  (quatro diferentes tipos de meios de cultivo x cinco concentrações de AIB) e cada tratamento continha 20 repetições, constituída por um tubo de ensaio, totalizando 400 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância com aplicação do teste F (5%) e as médias, analisadas por regressão, com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2003).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Aos 30 dias, as plântulas em meio de cultivo contendo sacarose sem carvão ativado obtiveram maior comprimento médio de parte aérea. Entre as concentrações de AIB, meio suplementado com  $36,9\ \mu\text{M}$  obteve maior valor médio (Figura 1)

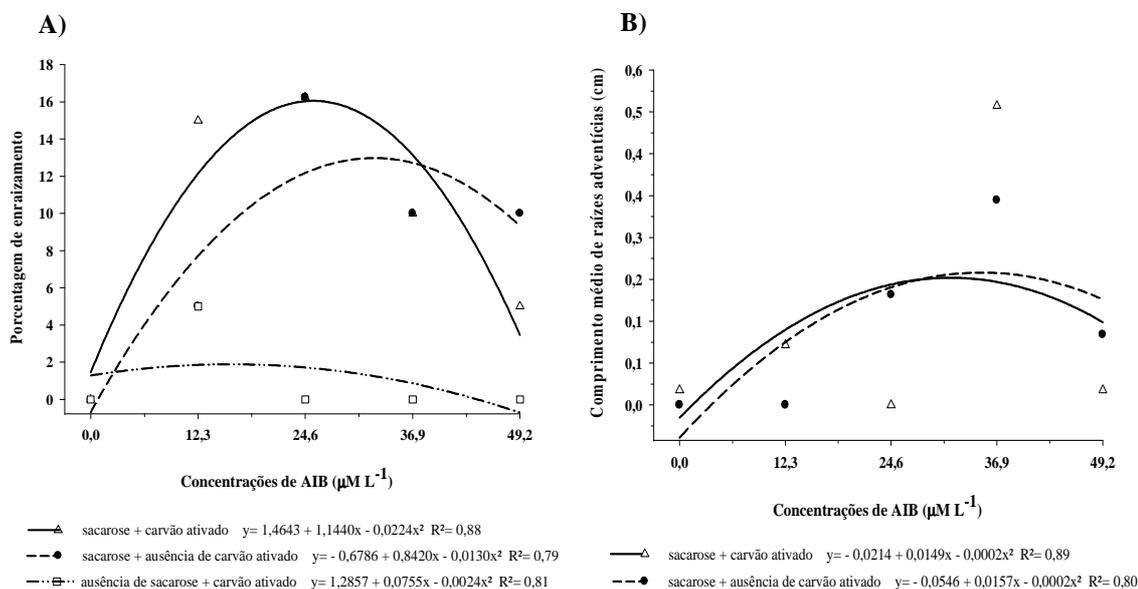
As diferentes composições do meio de cultivo não exerceram influência no número médio de folhas expandidas, gemas e brotações. Porém, entre as concentrações de AIB, para número médio de folhas expandidas a concentração de  $36,9\ \mu\text{M}$  proporcionou maior valor, enquanto para gemas e brotações na concentração de  $49,2\ \mu\text{M}$  obtiveram os maiores valores (Figura 1B, 1C e 1D).



**Figura 1.** Comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (A), número médio de folhas expandidas (B), gemas (C) e brotações laterais (D) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultivo WPM-50% com diferentes composições de meio e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012.

Os meios de cultivo com sacarose independente da utilização de carvão ativado proporcionaram maior porcentagem de enraizamento, para comprimento médio de raízes meio com sacarose e sem carvão ativado obteve maior valor médio. As

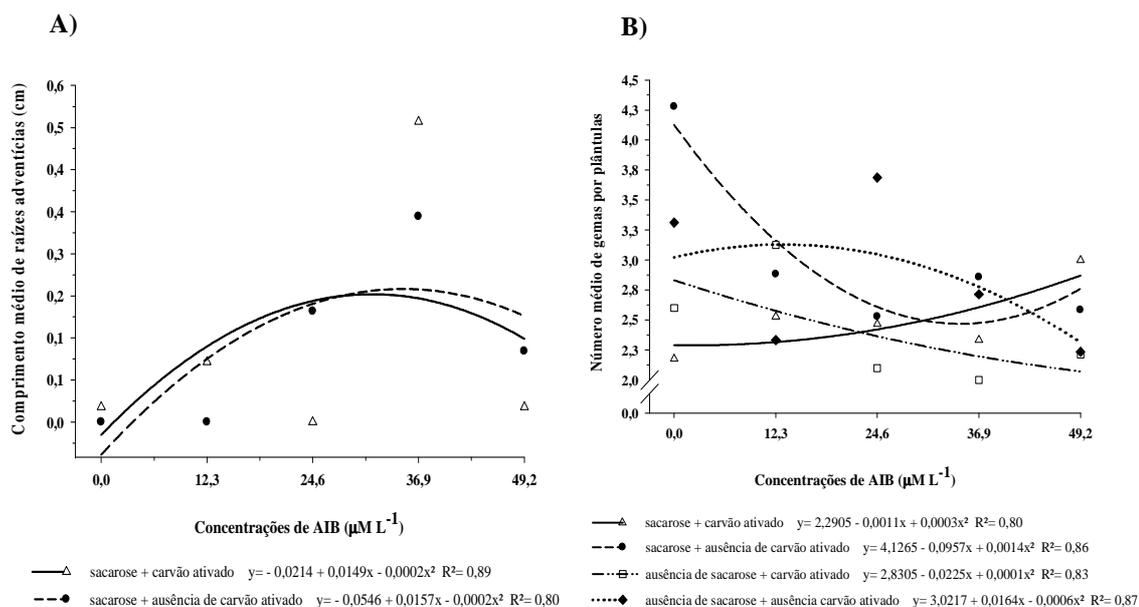
concentrações de 24,6  $\mu\text{M}$  e 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB proporcionaram respectivamente maior porcentagem de enraizamento e comprimento médio de raízes (Figura 2A e 2B).



**Figura 2.** Porcentagem de enraizamento (A) e comprimento médio de raízes adventícias (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes composições de meio de cultivo e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012.

Quando o meio de cultivo não foi suplementado com sacarose e carvão ativado não ocorreu enraizamento. Enquanto para comprimento médio de raízes não foram obtidos valores médios em meio de cultivo sem sacarose independente da utilização de carvão ativado. Não houve formação de calos em nenhum tipo de composição de meio de cultivo e concentração de AIB.

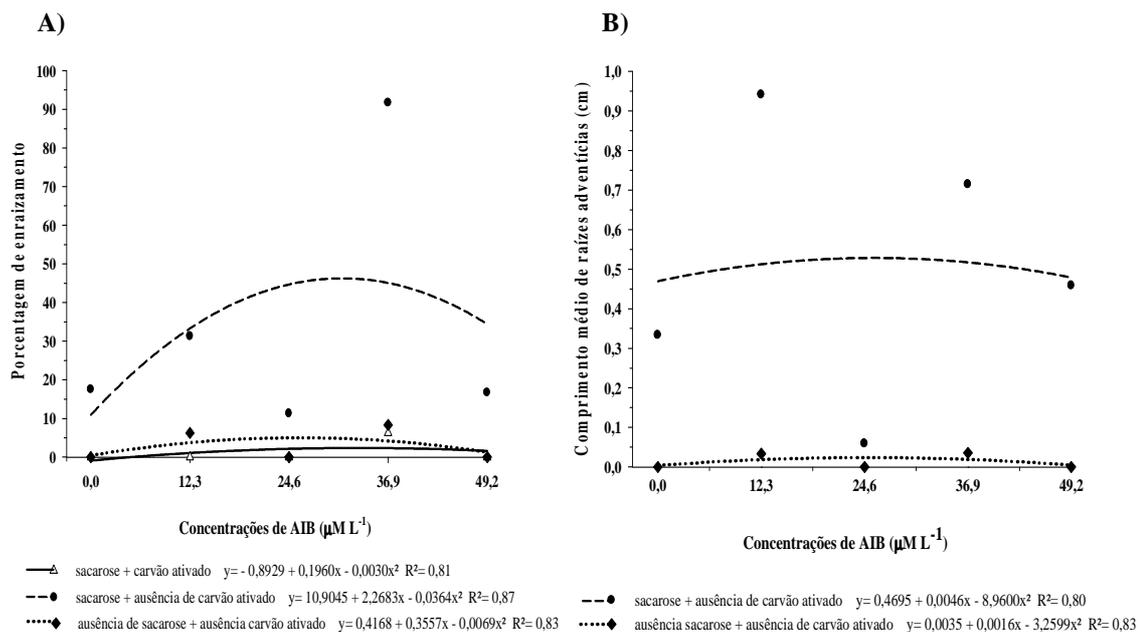
Aos 60 dias meio de cultivo com sacarose e ausência de carvão ativado foi o mais adequado para comprimento médio de parte aérea e número médio de gemas, obtendo os maiores valores médios, 2,5 e 3,07 cm, respectivamente. À medida que aumentou a concentração de AIB, houve redução tanto para o comprimento médio quanto para o número médio de gemas. Em ausência de AIB no meio de cultivo, foram obtidos os maiores valores médios (Figura 3A e 3B).



**Figura 3.** Comprimento médio das plântulas (A) e número médio de gemas (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012.

O cultivo de plântulas de mangabeira em meio de cultivo com sacarose e sem carvão ativado obteve as maiores médias para enraizamento *in vitro* de explantes de mangaba, a concentração de  $36,9\mu\text{M}$  de AIB foi a mais eficiente com valor médio de 91,67% (Figura 4A).

Para o comprimento médio de raízes foi verificado o mesmo comportamento da porcentagem de enraizamento, o meio de cultivo com sacarose e sem carvão ativado foi o mais adequado. Porém, entre as concentrações de AIB, ao utilizar  $12,3\mu\text{M}$  obteve maior valor médio (Figura 4B).

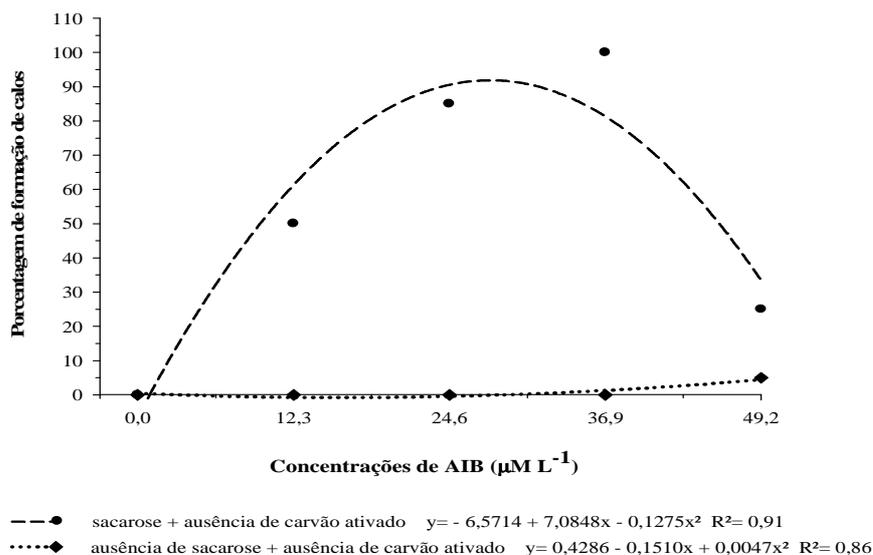


**Figura 4.** Porcentagem de enraizamento (A) e comprimento médio de raízes adventícias (B) de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012.

Em meio de cultivo sem sacarose e presença de carvão ativado não ocorreu enraizamento *in vitro* de plântulas de mangaba. Enquanto para comprimento médio de raízes, meio de cultivo com carvão ativado independente da utilização de sacarose foram obtidos valores médios.

Plântulas cultivadas em meio de cultivo com sacarose e ausência de carvão ativado obtiveram maior formação de calos. A concentração de  $36,9\mu\text{M}$  de AIB proporcionou maior formação de calos (Figura 5).

Não ocorreu formação de calos em meio de cultivo com carvão ativado independente da utilização de sacarose.



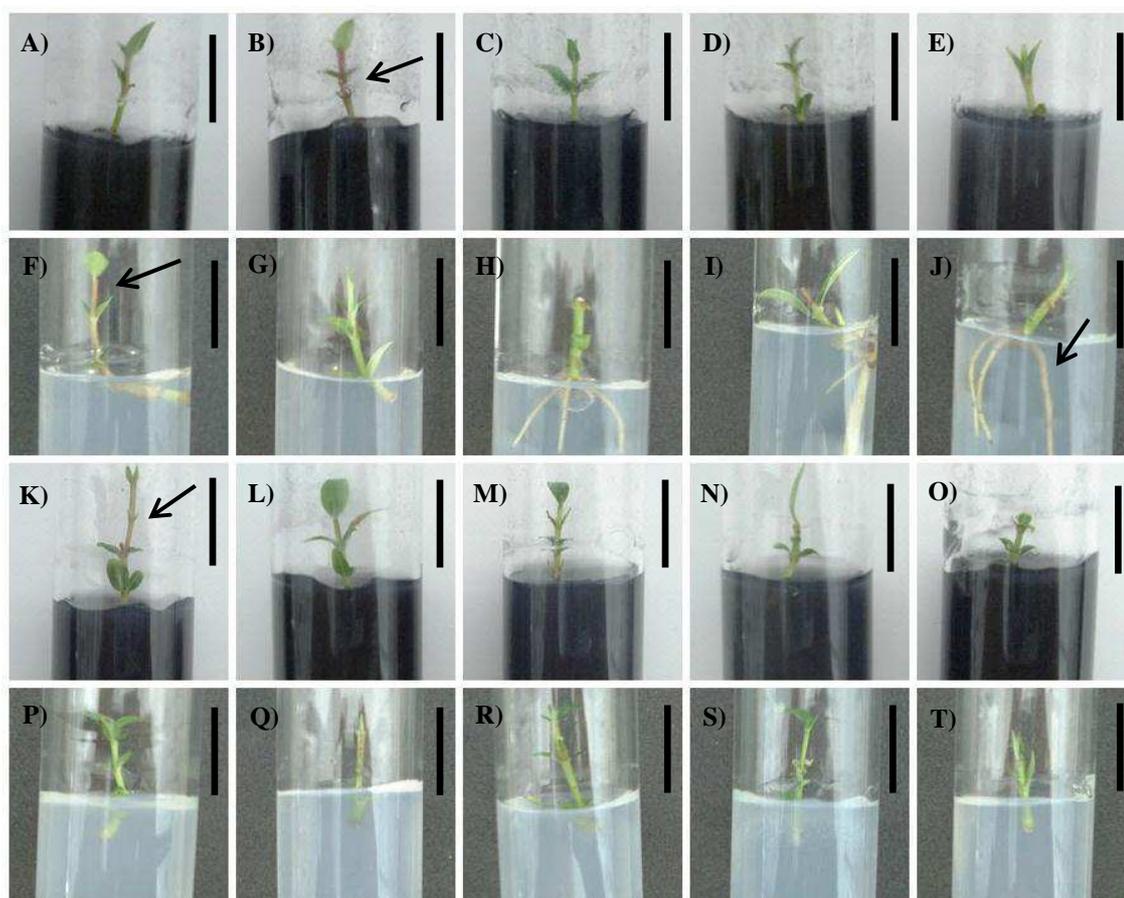
**Figura 5.** Porcentagem de formação de calos em plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. Rio Verde - GO, 2012.

Verificou-se, visualmente, aos 30 dias que no meio de cultivo contendo sacarose e carvão ativado suplementado com 12,3μM de AIB o caule das plântulas era de coloração roxo-avermelhado, que é característico da espécie (LÉDO et al., 2007), nas outras concentrações de AIB não foi observado a coloração, as folhas apesar de expandidas eram pequenas de coloração verde-escura e os explantes eram frágeis aos serem excisados (Figura 6A, 1B, 6C, 6D e 6E).

Visualmente plântulas cultivadas em meio de cultivo com presença de sacarose e ausência de carvão tinham menor quantidade de folhas expandidas. Quando o meio de cultivo não foi suplementado com AIB, o caule das plântulas era de coloração roxo-avermelhado, o que não foi observado nas outras concentrações. Houve formação de raízes adventícias nas concentrações 24,6, 36,9 e 49,2μM de AIB (Figura 6F, 6G, 6H, 6I e 6J).

Na ausência de sacarose com presença de carvão as folhas obtidas eram de coloração verde-escura mais acentuada e maiores, quando comparadas com os outros tratamentos. Na ausência de AIB, o caule era de coloração roxo-avermelhado, não sendo observada a coloração em outras concentrações (Figura 6K, 6L, 6M, 6N e 6O).

No meio de cultivo com ausência de sacarose e carvão ativado as folhas das plântulas apesar de expandidas eram rudimentares, os entrenós curtos e o caule despigmentado (verde-claro) (Figura 6P, 6Q, 6R, 6S e 6T).



**Figura 6.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 30 dias de cultivo *in vitro*, cultivadas em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. A) sacarose + carvão ativado + 0  $\mu\text{M}$  de AIB; B) sacarose + carvão ativado + 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; C) sacarose + carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; D) sacarose + carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; E) sacarose + carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; F) sacarose + ausência de carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; G) sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; H) sacarose + ausência de carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; I) sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; J) sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; K) ausência de sacarose + carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; L) sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; M) sacarose + ausência de carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; N) sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; O) sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; P) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; Q) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; R) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 26,6  $\mu\text{M}$  de AIB; S) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; T) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB. Coloração roxo-avermelhada no caule e raízes adventícias (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

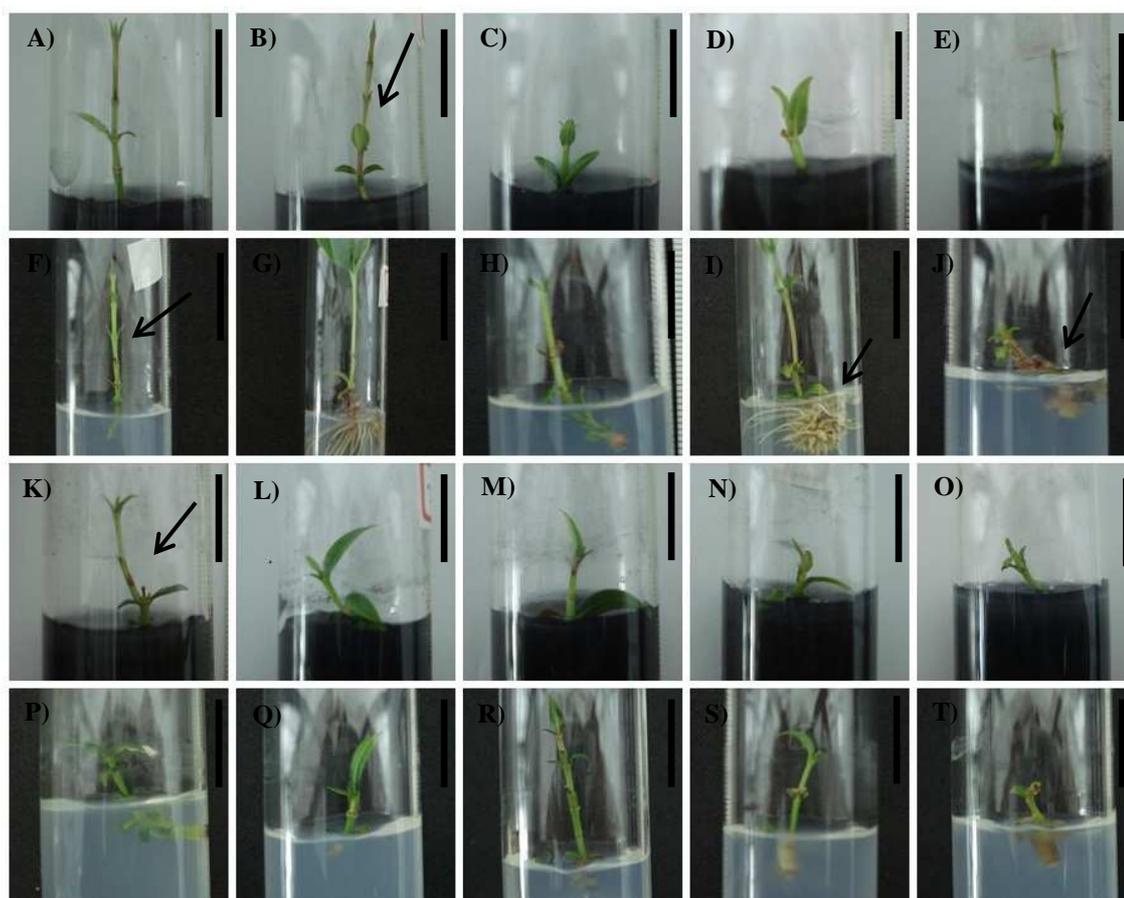
Aos 60 dias, verificou-se que as plântulas em meio de cultivo com sacarose e carvão ativado eram estioladas de coloração verde-clara, com isso eram frágeis ao

serem excisadas, as folhas apesar de estarem expandidas eram pequenas (Figura 7A, 7B, 7C, 7D e 7E).

Plântulas cultivadas em meio com sacarose sem carvão ativado eram estioladas, com entrenós curtos, ocorreu pouca quantidade de folhas expandidas e essas eram rudimentares. Houve grande formação de raízes adventícias nas concentrações de 12,3 e 36,9  $\mu\text{M}$  de IBA. E formação de calos na concentração de 49,2 $\mu\text{M}$  de AIB (Figura 7F, 7G, 7H, 7I e 7J).

No meio ausente de sacarose suplementado com carvão ativado as plântulas eram de coloração verde-escura. Porém quando ausente o AIB, as plântulas eram estioladas, e o caule despigmentado (verde-claro) (Figura 7K, 7L, 7M, 7N e 7O).

Na ausência de sacarose e carvão ativado as plântulas eram de coloração verde-escura, com folhas expandidas pequenas. Quando o meio foi suplementado com 0,0 e 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB os entrenós eram curtos (Figura 7P, 7Q, 7R, 7S e 7T).



**Figura 7.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 60 dias de cultivo *in vitro*, cultivadas em diferentes composições de meio e concentrações de AIB. A) sacarose + carvão ativado + 0  $\mu\text{M}$  de AIB; B) sacarose + carvão ativado + 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; C) sacarose + carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; D) sacarose + carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; E) sacarose + carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; F) sacarose + ausência de carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; G) sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; H) sacarose + ausência de carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; I) sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; J) sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; K) ausência de sacarose + carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; L) sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; M) sacarose + ausência de carvão ativado 24,6  $\mu\text{M}$  de AIB; N) sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; O) sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB; P) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 0  $\mu\text{M}$  de AIB; Q) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 12,3  $\mu\text{M}$  de AIB; R) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 26,6  $\mu\text{M}$  de AIB; S) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 36,9  $\mu\text{M}$  de AIB; T) ausência de sacarose + ausência de carvão ativado 49,2  $\mu\text{M}$  de AIB. Plântulas estioladas, raízes adventícias e formação de calos (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde - GO, 2012. Barra = 10mm.

Diferente dos resultados obtidos neste trabalho, Léo et al. (2007) ao utilizarem o meio de cultivo MS, com a metade da concentração de sais, adicionado de

2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, obtiveram maior comprimento médio da raiz principal e bom desenvolvimento da parte aérea de mangaba *in vitro*. De acordo com Soares et al. (2007), o meio suplementado com 3 mg L<sup>-1</sup> (14,76 µM L<sup>-1</sup>) de AIB proporcionou 20% das brotações de mangaba enraizadas. Concentração de 1mg L<sup>-1</sup> (4,92 µM L<sup>-1</sup>) de AIB proporcionou maior obtenção de enraizamento em brotações de uvaieira (*Eugenia pyriformis*) (NASCIMENTO et al. 2008). Para maior enraizamento de figueira (*Ficus carica* L.) cv. Roxo de Valinhos, a concentração de 5 mg L<sup>-1</sup> (24,60µM L<sup>-1</sup>) de AIB foi a adequada, enquanto para as cultivares Kadotta, Uruguay e Celeste, a concentração de 6 mg L<sup>-1</sup> (29,52 µM L<sup>-1</sup>) de AIB proporcionou maior enraizamento (BARBOSA et al., 2008). Maior taxa de enraizamento de framboeseira (*Rubus idaeus* L. 'Batum') ocorreu em meio de cultivo WPM suplementado com 0 e 3 µM de AIB (LEITZKE et al., 2009). Plântulas de mamoeiro 'Tainung 01' (*Carica papaya* L.) obtiveram maior percentual de enraizamento em meio suplementado com 5,92 µM de AIB (SCHMILDT et al., 2010).

Plântulas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) cultivadas na concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose obtiveram maior enraizamento (CALVETE et al., 2002). Concentrações de 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose favoreceram maior crescimento das plântulas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen) (SKREBSKY et al., 2004). Enquanto para amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos a ausência de sacarose proporcionou maior enraizamento das plântulas *in vitro* (AUGUSTO et al., 2006). Na combinação de 6 mg L<sup>-1</sup> (29,52 µM L<sup>-1</sup>) de AIB e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose ocorreu maior número médio de raízes de porta-enxerto de citros (PIO et al., 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a ausência de sacarose *in vitro* não beneficia o crescimento das plântulas de mangaba. Quando o meio foi suplementado com sacarose, propiciou maior crescimento das plântulas. A concentração de 36,9 µM de AIB induziu maior enraizamento *in vitro*, porém, ocorreu maior formação de calos nessa concentração, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

#### 4. CONCLUSÃO

Meio de cultivo com sacarose sem carvão ativado suplementado com 36,9 µM de AIB proporcionou maior crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de mangabeira.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 473-476, 2006.

BARBOSA, W.; PIO, R.; VEIGA, R. F. de A.; CHAGAS, E. A.; FELDBERG, N. P.; CAMPAGNOLO, M. A.; DALASTRA, I. M. Efeito das concentrações do AIB no enraizamento *in vitro* de cultivares de figueira. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, p. 1-6, 2008.

BARROS, D. I.; BRUNO, R de L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação. **Revista Acta Tecnológica**, v. 5, n. 1, p. 31-43, 2010.

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

CALDAS, L. S.; MACHADO, L. de L.; CALDAS, S. C.; CAMPOS, M. L.; CALDAS, J. A.; PHARIS, R. P.; PEREIRA-NETTO, A. B. Growth-active gibberellins overcome the very slow shoot growth of *Hancornia speciosa*, an important fruit tree from the Brazilian "Cerrado". **Trees**, v. 23, p. 1229-1235, 2009.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.

COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - versão 4,3. DEX/UFLA - Lavras, MG, 2003.

KRATZ, D.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; Concentrações de ácido indolbutírico no enraizamento de *Cryptomeria japonica*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 14-21, 2011.

LÉDO, A. da S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

NASCIMENTO, A. da C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2008.

PIO, R.; RAMOS, J. D.; PIO, L. A. S.; MENDONÇA, V.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citros *Tangerina sunki* x *Trifolia english* 63-256 com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 1, p. 66-70, 2002.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos da macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

SANTOS, A. F. dos; SILVA, S. de M.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E. Conservação pós-colheita de mangaba em função da maturação, atmosfera e temperatura de armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 85-91, 2009.

SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do; SCHMILDT, O.; COELHO, R. I.; RABELLO, W. S.; MARTINS FILHO, S. Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 125-129, 2010.

SKRESKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.

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

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sob a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320 p., 2006.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v. 7, p. 53-65, 1943.

## CAPÍTULO VI

### POPULAÇÃO DE SOLUBILIZADORES E NÃO SOLUBILIZADORES DE FOSFATO EM SOLO DE MANGABEIRA

#### RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar as populações de bactérias e fungos solubilizadores de fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) em solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e quantificar a solubilização de fosfatos pelos isolados obtidos em meio sólido. Amostras de solo rizosférico de mangaba foram coletadas e homogeneizadas 10 g dessa mistura foi misturado em 90 mL de solução salina (0,85%), seguindo o método das diluições sucessivas até  $10^{-5}$ . Em seguida, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram transferidas para placas de Petri esterilizadas, contendo os seguintes meios de cultura: GL adicionado de  $\text{CaHPO}_4$  (10%) e meio de cultura Gadagi e Sá cultura suplementado com  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , para avaliação de solubilização de fosfato de alumínio e ferro. Para cada isolado obtido em ambos os meios de cultura, foi quantificado o índice de solubilização (IS) em cada fonte fosfatada. Foram obtidos 15 isolados, sendo 12 fúngicos (MC1, MC2, MA1, MA2, MA3, MA4, MA5, MA6, MF1, MF2, MF3 e MF4) e três bacterianos (MF5, MF6 e MF7), que foram escolhidos por diferenças morfológicas, coloração, tamanho das colônias e tamanho de halos. A utilização de meio de cultura contendo  $\text{FePO}_4$  é o mais indicado para isolamento de microrganismos solubilizadores de fosfato em solo rizosférico de mangaba. Entre os 15 isolados obtidos, apenas sete demonstraram capacidade para solubilizar as três fontes de fosfato utilizadas. Os maiores índices de solubilização para fosfato de alumínio, cálcio e ferro, foram atingidos pelos isolados MF5, MA3 e MA6, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa* Gomes, fosfato, cerrado.

## CHAPTER VI

### POPULATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING AND NO-SOLUBILIZING IN SOIL OF MANGABEIRA

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the populations of aluminum phosphate ( $\text{AlPO}_4$ ), calcium ( $\text{CaHPO}_4$ ) and iron ( $\text{FePO}_4$ ) solubilizing bacteria and fungi in soil of mangaba (*Hancornia speciosa*) and quantify the phosphate solubilization by the isolates obtained in solid medium. Rhizosphere soil samples were collected from mangaba and mixed, then 10 g of this sample was mixed in 90 ml of saline (0.85%), following the method of successive dilutions until  $10^{-5}$ . Then 200  $\mu\text{L}$  aliquots were transferred into sterile Petri dishes, containing the following media: GL added with  $\text{CaHPO}_4$  (10%) and Gadagi and Sa culture medium supplemented with  $\text{AlPO}_4$  and  $\text{FePO}_4$  for evaluation of phosphate, aluminum and iron solubilization. For each isolate in both culture media was measured the solubilization index (SI) in each phosphorus source. There were obtained 15 isolates, being 12 fungal (MC1, MC2, MA1, MA2, MA3, MA4, MA5, MA6, MF1, MF2, MF3 and MF4) and three bacterial (MF5, MF6 and MF7), which were chosen by morphological differences color, size of colonies and halos size. The use of a culture medium containing  $\text{FePO}_4$  is the most suitable for isolation of phosphate solubilizing microorganisms in mangaba rhizosphere. Among the 15 isolates, only seven have demonstrated ability to solubilize the three phosphate sources used. The highest rates of solubilization for aluminum, calcium and iron phosphate were affected by isolated MF5, MA3 and MA6, respectively.

**Key words:** *Hancornia speciosa*, phosphate, cerrado

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as árvores frutíferas nativas do cerrado, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca como uma das mais promissoras para os programas de exploração sustentável nesse bioma. Seu fruto é apreciado pelas suas características físicas, aroma e sabor, além de ser uma fonte rica em proteína (1,3 a 3,0%) (PINHEIRO et al., 2001; CALDAS et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

A mangaba contém uma polpa branca, agridoce e aromática, sendo 80% da polpa aproveitada na forma de sucos, sorvetes, licores, doces, vinho e vinagre ou consumida *in natura* (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2009). Sua borracha tem potencial de uso industrial, as características físico-mecânicas conferem à borracha da mangabeira boas características tecnológicas, podendo ser usada em aplicações comerciais (VIEIRA et al., 2006; SOARES et al., 2007).

Os microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) inorgânicos desempenham importante papel no suprimento de fósforo (P) às plantas. Este fato tem despertado a atenção para o uso desses microrganismos como inoculante comercial ou no manejo de suas populações, como forma de maximizar a utilização do P existente no solo ou do adicionado como fertilizante. Estudos indicam que estes organismos podem beneficiar o desenvolvimento de mudas em viveiro, maximizando a capacidade de estabelecimento das mesmas em campo (SILVA FILHO & VIDOR, 2001; SOUCHIE et al., 2005). O tipo de solo, a espécie vegetal e a idade das plantas afetam a população de solubilizadores (NAHAS et al., 1994; SOUCHIE et al., 2006). Esses microrganismos são capazes de aumentar a solubilização de fosfatos de rocha, resultando em melhor desenvolvimento das plantas. Além de solubilizar fosfatos de cálcio (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), podem também solubilizar fosfatos de ferro e alumínio (GADAGI & SÁ, 2002).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) representam porcentagem significativa do total de microrganismos na rizosfera de várias espécies vegetais, desempenhando papel importante no suprimento de P às plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A maior parte do P dos solos brasileiros se encontra sob formas pouco solúveis, tornando indisponível para a maioria das plantas (SILVA FILHO et al., 2002). Predominantemente, esses solos possuem avançado grau de intemperismo, sendo requeridas pesadas adubações fosfatadas para obter produtividade satisfatória das

culturas, em que o P é pouco disponível, sendo que cerca de 75% do P aplicado ao solo é perdido ou fica retido nas suas partículas, o que contribui para seu acúmulo em formas não disponíveis nos solos cultivados (SOUCHIE et al., 2005; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Na maioria dos solos ácidos, predominantes no cerrado brasileiro, a maior parte do P forma complexos com os óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al) e, em solos alcalinos e neutros, encontra-se ligado ao cálcio (Ca) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Antes, porém são necessários estudos de ecologia microbiana para conhecer seu papel/importância na nutrição mineral de plantas de um determinado ecossistema.

A produção de mudas de espécies frutíferas nativas é de interesse para o estado de Goiás, principalmente visando à recomposição dos cerrados e a produção comercial dessas espécies (SOUZA et al., 2001; SILVA et al., 2008).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar as populações de bactérias e fungos solubilizadores de fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) em solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e quantificar a solubilização de fosfatos pelos isolados obtidos em meio sólido.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O solo rizosférico e não rizosférico (250g) foram coletados próximo ao sistema radicular de cinco plantas de mangabeira, a 50cm de profundidade, em janeiro de 2011, em área de reserva de cerrado na Fazenda Gameleira, localizada no município de Montes Claros de Goiás – GO ( $16^\circ 06' 20''$  S –  $51^\circ 17' 11''$  W), a 592m de altitude. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano - Campus Rio Verde, GO.

### 2.1. Isolamento e enumeração populacional de microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio (MSFC), ferro (MSFF) e alumínio (MSFA) e não solubilizadores

As amostras de solo rizosférico e não rizosférico de cada planta, para isolamento dos microrganismos e avaliação da densidade populacional, foram homogeneizadas, e retiradas dessa mistura 10 g de solo, misturado em 90 mL de solução salina (0,85%), seguindo o método das diluições sucessivas até  $10^{-5}$ . De cada

diluição, foram transferidas alíquotas de 200 µL para placas de Petri esterilizadas, contendo os seguintes meios de cultura: GL (glicose 10 g; extrato de levedura 2 g e ágar 15 g), adicionado de uma solução de  $\text{CaHPO}_4$  (10%), formado pela adição de 25 mL de  $\text{CaCl}_2$  (10%) e 12,5 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10%), conforme Sylvester-Bradley et al. (1982). Similarmente, foi avaliado o meio de cultura modificado por Gadagi e Sá (2002) (sacarose 10 g; ágar 15 g; NaCl 0,1 g;  $\text{MgSO}_4$  0,5 g; extrato de levedura 0,2 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,1 g) suplementado com  $\text{FePO}_4$  2 g ou  $\text{AlPO}_4$  5 g para avaliação da capacidade de solubilização de fosfato. Para tanto, como indicador de pH do meio, foi utilizado o corante verde de bromocresol (BCG), para o qual foi preparada uma solução estoque na concentração de 0,5%, em álcool 70%, com pH ajustado para 6,5.

O número de isolados solubilizadores de fosfato de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$ , assim como os de não solubilizadores, foi determinado a partir de contagem direta em placas (triplicata) das unidades formadoras de colônias (UFC) após, no mínimo dois e, no máximo, seis dias de incubação, a 28 °C. O aparecimento de um halo transparente, em contraste com o meio opaco em volta da colônia dos isolados de bactéria (BSF) ou de fungo (FSF) foi o indicativo de positividade. Esse halo indica a solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  contido no meio (BARROSO & OLIVEIRA, 2001; SOUCHIE et al., 2007). A mudança de pH do meio, com consequente mudança de cor deste, foi indicativo de positividade para solubilizador de  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$  (GADAGI & SÁ, 2002).

## **2.2. Teste de solubilização de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), ferro ( $\text{FePO}_4$ ) e alumínio ( $\text{AlPO}_4$ )**

Os microrganismos rizosféricos solubilizadores de cálcio, ferro e alumínio obtidos no item anterior, foram selecionados a partir diferenças morfológicas, coloração, formação de colônias e tamanho dos halos. Após foram avaliados quanto a capacidade de solubilização de três fontes fosfatadas. Os MSFA foram testados para  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , os MSFC para  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  e os MSFF para  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$ .

### **2.2.1. Capacidade dos microrganismos solubilizarem diferentes tipos de fosfatos**

Os isolados fúngicos foram crescidos em meio BDA (infusão de 200 g de batata, dextrose 20 g e ágar 15 g) por três dias a 30 °C. Posteriormente discos de 5 mm com crescimento micelial contendo meio foram distribuídos em placas de Petri (um

disco por placa), contendo meio de cultivo modificado por Gadagi & Sá (2002) para teste de solubilização de fosfato de  $\text{FePO}_4$  e de  $\text{AlPO}_4$  e meio de cultivo GL adicionado de uma solução de  $\text{CaHPO}_4$  (10%), descrito por Sylvester-Bradley et al. (1982) para teste de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ . As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C, durante 15 dias.

Os isolados bacterianos obtidos foram crescidos em caldo nutriente (extrato de carne 3 g e peptona 5 g) *over night*, sob agitação, a 30 °C. Em seguida, foram transferidos 5 $\mu$ L (por placa) de cada uma das culturas para placas de Petri contendo meio GL adicionado de solução de  $\text{CaHPO}_4$  (10%), conforme descrito por Sylvester-Bradley et al. (1982) para teste de solubilização de cálcio e meio de cultivo modificado por Gadagi e Sá (2002) para teste de solubilização de fosfato de Fe e de Al.

### **2.3. Quantificação da solubilização de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), ferro ( $\text{FePO}_4$ ) e alumínio ( $\text{AlPO}_4$ )**

Os 15 isolados rizosféricos, sendo 12 fúngicos (MC1, MC2, MA1, MA2, MA3, MA4, MA5, MA6, MF1, MF2, MF3 e MF4) e três bacterianos (MF5, MF6 e MF7), foram avaliados quanto à solubilização de fosfato de Ca, Fe e Al nos meios sólidos até o 12º dia de incubação. O diâmetro dos halos ao redor do micélio (fungos) e colônias (bactérias) foi mensurado a cada três dias e, ao final de 12 dias, calculado o Índice de Solubilização (IS) (BERRAQUEIRO et al., 1976). A solubilização foi classificada, de acordo com Hara e Oliveira (2005), em baixa solubilização ( $\text{IS} < 2$ ), média solubilização ( $2 < \text{IS} < 3$ ) e alta solubilização ( $\text{IS} > 3$ ).

$$\text{IS} = \frac{\text{Diâmetro do Halo}}{\text{Diâmetro do micélio ou colônia}}$$

Para os isolados fúngicos, o IS foi calculado ao 5º dia de incubação, antes que as colônias tomassem toda a área da placa. A capacidade de solubilização foi avaliada em triplicata para cada isolado e para cada fosfato testado. Os dados numéricos relativos à evolução dos halos de solubilização foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Scott – Knott (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Isolamento e enumeração populacional de microrganismos solubilizadores de cálcio (MSFC), ferro (MSFF) e alumínio (MSFA) e não solubilizadores

Visualmente foi observada considerável variação de fungos miceliais e colônias mucosas, entre os diferentes tipos de meio de cultura utilizados para determinar a densidade populacional de solubilizadores de fosfato e não solubilizadores. Entre os meios de cultura, o meio GL foi o menos adequado para crescimento de microrganismos solubilizadores em solo desta espécie arbórea. Não foram obtidas bactérias solubilizadoras de Ca e a quantidade de fungos foi inferior ( $100,00 \times 10^5$ ), se comparada aos demais meios. No meio com  $\text{AlPO}_4$ , também não foram obtidas bactérias solubilizadoras de fosfato de Al, enquanto para fungos houve crescimento de  $133,33 \times 10^5$  UFC g solo<sup>-1</sup>. Para isolamento de microrganismos solubilizadores de Fe, cresceram isolados bacterianos e fúngicos no meio contendo  $\text{FePO}_4$ , com valores médios de 300 e  $467 \times 10^5$  UFC g solo<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Quantificação de microrganismos solubilizadores e não-solubilizadores de fosfato, isolados de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em diferentes meios de cultura. Rio Verde – GO, 2012.

Meios de cultura	Microrganismos			
	Solubilizadores		Não solubilizadores	
	Bactérias	Fungos	Bactérias	Fungos
	Nº x 10 <sup>5</sup> UFC g solo seco <sup>-1</sup>		Nº x 10 <sup>5</sup> UFC g solo seco <sup>-1</sup>	
GL	0,00	100,00	100,00	250,00
$\text{AlPO}_4$	0,00	133,33	250,00	583,33
$\text{FePO}_4$	300,00	467,00	333,33	500,00

Porém, o meio suplementado com  $\text{AlPO}_4$ , percentualmente foi inferior ao GL, em que foi obtido valores de 14 e 22%, para isolamento de solubilizadores de fosfato, enquanto o meio de cultura com  $\text{FePO}_4$  obteve 46%.

Quanto ao isolamento de microrganismos não solubilizadores, em todos os meios, o número de isolados fúngicos foi superior ao de bactérias. No meio contendo  $\text{AlPO}_4$  foi obtido maior número de fungos ( $583,33 \times 10^5$  UFC g solo<sup>-1</sup>), enquanto maior

número de bactérias foi obtido no meio contendo  $\text{FePO}_4$  ( $333,33 \times 10^5$  UFC g solo<sup>-1</sup>) (Tabela 1).

Comparando o número de isolados de microrganismos solubilizadores de fosfatos, entre os meios, nota-se que o número de isolados bacterianos ( $300,00 \times 10^5$  UFC g solo<sup>-1</sup>) e fúngicos ( $467,00 \times 10^5$  UFC g solo<sup>-1</sup>) foi maior quando  $\text{FePO}_4$  foi utilizado (Tabela 1).

Com os resultados obtidos, verifica-se que o meio suplementado com  $\text{FePO}_4$  foi o mais adequado para contagem de maior número de MSF. Os solos do cerrado, em sua maioria, apresentam elevada acidez e o íon P, predominantemente se encontra complexado aos cátions metálicos de  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$  (CHAGAS JUNIOR et al., 2010). Desta forma, é natural que seja detectada maior no de solubilizadores de fosfato.

Ao final, foram selecionados 15 microrganismos, sendo dois solubilizadores de fosfato de  $\text{CaHPO}_4$  (MC1 e MC2), seis solubilizadores de fosfato de  $\text{AlPO}_4$  (MA1, MA2, MA3, MA4, MA5 e MA6) e sete solubilizadores de fosfato de  $\text{FePO}_4$  (três bactérias: MF5, MF6 e MF7 e 4 fungos: MF1, MF2, MF3, MF4). A seleção se baseou nas diferenças morfológicas, quanto a coloração, forma e tamanho das colônias.

### **3.2. Quantificação da solubilização de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), ferro ( $\text{FePO}_4$ ) e alumínio ( $\text{AlPO}_4$ )**

Quanto ao índice de solubilização (IS) para  $\text{AlPO}_4$ , o isolado MF5 obteve o maior valor (9,00), sendo classificado como alta solubilização. Contrariamente, o MC1 obteve a menor média (1,10), ficando dentro da faixa de baixa solubilização (Figura 2). O isolado MA3 obteve alta solubilização (3,60) para  $\text{CaHPO}_4$ , ao contrário do MA1, que com o valor médio de 0,28 teve baixa solubilização para essa fonte de fosfato (Figura 5). O maior IS para  $\text{FePO}_4$  foi obtido pelo isolado MA6, com valor médio de 9,00, classificado como alta solubilização. O isolado MA3 obteve baixo IS (1,29) (Figura 2).

Entre as fontes fosfatadas, para os isolados solubilizadores de fosfato de Ca, foi constatado maior IS para  $\text{FePO}_4$ . Para os isolados solubilizadores de fosfato de Al para MA2 e MA3 os maiores valores médios foram obtidos para  $\text{CaHPO}_4$ , sendo que ambos os valores foram classificados como médio IS. Para o MA1 e MA5, os maiores valores foram detectados quando se utilizou  $\text{AlPO}_4$ , com baixa IS. O isolado MA6 obteve maior valor quando  $\text{FePO}_4$  foi utilizado, obtendo alta IS. Não ocorreu diferença entre os

valores de solubilização de  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  para o isolado MA4, sendo que o mesmo não solubilizou  $\text{CaHPO}_4$  (Figura 2).

Os isolados MF2, MF1, MF4 e MF5 demonstraram maiores valores no  $\text{AlPO}_4$ , com IS baixo, médio e alto, respectivamente (Figura 2). O MF7 demonstrou alto IS quando  $\text{FePO}_4$  foi utilizado. Para o MF3, foram observados maiores valores para  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , sendo classificado como médio IS. Esse isolado foi o único entre os microrganismos solubilizadores de  $\text{FePO}_4$  que solubilizou as três fontes de fosfato.

**Tabela 2.** Índice de solubilização (IS) de  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  e  $\text{CaHPO}_4$  de isolados obtidos de solo de managabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aos 12 dias de cultivo *in vitro*. Rio Verde – GO, 2012.

	Isolados	IS $\text{AlPO}_4$	IS $\text{CaHPO}_4$	IS $\text{FePO}_4$
Solubilizadores de $\text{CaHPO}_4$	MC1	1,29 Ib	1,13 Ec	1,64 Ga
	MC2	1,10 Jc	1,13 Eb	1,20 Ka
Solubilizadores de $\text{AlPO}_4$	MA1	1,80 Fa	0,28 Fc	1,30 Ib
	MA2	1,50 Hb	2,00 Ba	1,20 Kc
	MA3	3,00 Db	3,60 Aa	1,29 Jc
	MA4	2,25 Ea	NS	2,25 Ea
	MA5	1,64 Ga	1,20 Dc	1,38 Hb
	MA6	4,50 Bb	NS	9,00 Aa
Solubilizadores de $\text{FePO}_4$	MF1	3,00 Da	NS	2,20 Fb
	MF2	1,64 Ga	NS	1,20 Kb
	MF3	2,25 Ea	1,80 Cb	2,5 Ea
	MF4	4,50 Ba	NS	3,6 Db
	MF5	9,00 Aa	NS	8,5 Bb
	MF6	4,50 Ba	NS	4,5 Ca
	MF7	3,60 Cb	NS	4,5 Ca

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

NS= não ocorreu formação de halos de solubilização.

Em relação à capacidade de solubilização de fosfato Pedrinho et al. (2010) observaram que de 58 isolados de raízes de milho, 27 tinham a capacidade de solubilização. Neste trabalho, entre os microrganismos solubilizadores de fosfato de Ca, todos solubilizaram fosfato de Fe e de Al. Entre os microrganismos solubilizadores de fosfato de Al apenas o MA4 e MA6 não solubilizaram  $\text{CaHPO}_4$ , enquanto para Fe todos demonstraram capacidade de solubilização. Diferentemente, entre os microrganismos

solubilizadores de fosfato de Fe, apenas o MF3 demonstrou capacidade de solubilizar fosfato de Ca e de Al, enquanto os demais isolados solubilizaram apenas  $\text{AlPO}_4$ .

Dos 15 isolados oriundos de solo rizosférico de mangaba, sete (MC1, MC2, MF3, MA1, MA5, MA3 e MA2) demonstraram capacidade de solubilizar  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ . Para o IS para  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  os isolados MF5, MA3 e MA6 demonstraram os maiores valores.

#### 4. CONCLUSÕES

A utilização de meio de cultura descrito por Gadagi e As (2002), contendo  $\text{FePO}_4$ , é o mais indicado para isolamento de microrganismos solubilizadores de fosfato em solo rizosférico de mangaba.

Dentre os 15 isolados obtidos, apenas sete demonstraram capacidade para solubilizar as três fontes de fosfato utilizadas.

Os maiores índices de solubilização para  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , foram atingidos pelos isolados MF5, MA3 e MA6, respectivamente.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, C. B.; OLIVEIRA, L. A. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio nas raízes de plantas na Amazônia Brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 575-581, 2001.

BERRAQUEIRO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Farmacéutica**, v. 17, p. 399-406, 1976.

CALDAS, L. S.; MACHADO, L. de L.; CALDAS, S. C.; CAMPOS, M. L.; CALDAS, J. A.; PHARIS, R. P.; PEREIRA-NETTO, A. B. Growth-active gibberellins overcome the very slow shoot growth of *Hancornia speciosa*, an important fruit tree from the Brazilian “Cerrado”. **Trees**, v. 23, p. 1229-1235, 2009.

COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - versão 4,3. DEX/UFLA - Lavras, MG, 2003.

GADAGI, R. S.; SA, T. New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 48, p. 615-618, 2002.

HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-662, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras. Editora UFLA. 2006.729 p.

NAHAS, E.; FORNASIERI, D. J.; ASSIS, L. C. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. **Scientia Agricola**, v.51, p. 463-469, 1994.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. de M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.

SANTOS, A F. dos; SILVA, S. de M.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E. Conservação pós-colheita de mangaba em função da maturação, atmosfera e temperatura de armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 85-91, 2009.

SILVA, M. R.; SANTOS JÚNIOR, R. T. de O.; FERREIRA, C. C. C. Estabilidade da vitamina C em cagaita *in natura* e durante a estocagem da polpa e refresco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 1, p. 53-58, 2008.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

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

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. da. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUCHIE, E. L. ; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.; CAMPELLO, E. F. C. ; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ - Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 183-193, 2006.

SOUZA, E. R. B. de; CARNEIRO, I. F.; NAVES, R. V.; BORGES, J. D.; LEANDRO, W. M.; CHAVES, L. J. Emergência e crescimento de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) em função do tipo e do volume de substratos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 31, n. 2, p. 89-95, 2001.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p.15-22. 1982.

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320 p., 2006.

## CAPÍTULO VII

### SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO *IN VITRO* POR MICRORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE MANGABEIRA

#### RESUMO

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) representam porcentagem significativa do total de microrganismos na rizosfera de várias espécies vegetais, desempenhando papel importante no suprimento de fósforo (P). Além disso, a produção de fitormônios por bactérias é um dos responsáveis pelo aumento de crescimento, observado em algumas plantas. Objetivou-se com esse trabalho avaliar a produção de ácido indol acético (AIA) e a solubilização, em meio líquido, de fosfato de  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  por microrganismos isolados de solo rizosférico de mangabeira. Quinze isolados rizosféricos tiveram seu potencial avaliado quanto à capacidade de solubilização das três fontes fosfatadas supracitadas e de produção de AIA, utilizando o método colorimétrico,. Maiores taxas de solubilização para  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  foram atingidas pelos isolados MC1 e MC2, respectivamente. Para os isolados MC1, MC2, MA5 e MF4 possibilitaram as maiores médias para  $\text{CaHPO}_4$ . De modo geral, todos os isolados possibilitaram os maiores valores quando o meio de cultura estava suplementado com  $\text{FePO}_4$ . A maior produção de AIA foi obtida pelo isolado MF6.

**Palavra-chaves:** *Hancornia speciosa* Gomes, meio líquido, fitormônio.

## CHAPTER VII

### PHOSPHATE SOLUBILIZATION AND INDOLEACETIC ACID PRODUCTION *IN VITRO* BY MICROORGANISMS OF MANGABEIRA RHIZOSPHERE

#### ABSTRACT

The phosphate solubilizing microorganisms (MSF) represent a significant percentage of total microorganisms in the rhizosphere of several plant species, playing an important role in the supply of phosphorus (P). Furthermore, the production of hormones by bacteria is responsible by increase growth observed in some plants. The objective of this study was to evaluate the production of indoleacetic acid (IAA) and solubilization in liquid medium, of phosphate  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{FePO}_4$  by microorganisms isolated from rhizosphere soil of *H. speciosa*. Fifteen rhizospheric isolates were evaluated for their potential ability to solubilize phosphate from the three sources mentioned above and the production of IAA, using the colorimetric method. Higher rates of solubilization for  $\text{AlPO}_4$  and  $\text{FePO}_4$  were affected by isolated MC1 and MC2, respectively. The isolated MC1, MC2, MA5 and MF4 allowed the highest averages for  $\text{CaHPO}_4$ . In general, all isolates allowed the highest values when the culture medium was supplemented with  $\text{FePO}_4$ . The highest IAA yield was obtained by MF6 isolate.

**Key words:** *Hancornia speciosa*, a liquid medium, phytohormone

## 1. INTRODUÇÃO

Há microrganismos rizosféricos capazes de produzir fitormônios, exercer controle biológico de fitopatógenos e/ou solubilizar fosfatos (SILVEIRA & FREITAS, 2007; STEINER et al., 2009). Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) representam porcentagem considerável do total de microrganismos na rizosfera de várias espécies vegetais, desempenhando importante papel no suprimento de P às plantas. Entre os mecanismos utilizados pelos microrganismos para que ocorra a solubilização de fosfatos se destaca a produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; KUSS et al., 2007; CHAGAS JUNIOR et al., 2010).

Apesar da predominância de bactérias solubilizadoras de fosfatos (BSF) no solo, geralmente os fungos (FSF) apresentam maior potencial de solubilização. A maioria é capaz de solubilizar fosfatos de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), mas poucos são capazes de solubilizar fosfatos de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) (SIQUEIRA et al., 1999). A atuação no ciclo do P e sua influência na nutrição vegetal devem ser mais exploradas, por influenciar, desde as transformações deste nutriente no solo ou na rizosfera, até sua absorção e translocação na planta. Porém, a seleção desses microrganismos depende do conhecimento de suas características, sendo a mais importante, a capacidade de solubilização de fosfatos (SILVA FILHO & VIDOR, 2001).

A produção de fitormônios por bactérias é um dos responsáveis pela maximização do crescimento observado em algumas plantas. Substâncias como auxinas, citocininas e giberelinas foram detectados no sobrenadante do cultivo de bactérias do gênero *Azospirillum*, sendo que, entre as auxinas, o ácido indolacético (AIA) é o mais estudado e o mais produzido pelas mesmas. Essa substância afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares (RADWAN et al., 2004; RADWAN et al., 2005).

Objetivou-se com esse trabalho quantificar a produção de AIA e a solubilização de  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , em meio líquido, por microrganismos isolados de solo de mangabeira.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de solubilização *in vitro* e produção de AIA foram realizados com os 15 isolados obtidos de solo de mangabeira no item anterior.

### 2.1. Quantificação da solubilização em meio líquido de fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ )

Os isolados bacterianos cresceram em meio de cultivo líquido MS ( $\text{NaCl}$  - 0,1 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 1,0 g;  $\text{KCl}$  - 0,2 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 1,2 g; glicose - 10 g e extrato de levedura), descrito por Barroso e Nahas (2008). Para a avaliação da solubilização, foi adicionado ao meio de cultura  $1,26 \text{ g L}^{-1}$  de cada uma das fontes fosfatadas ( $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ ). Os isolados ficaram sob agitação constante com o auxílio de agitador orbital - Shaker (Nova Técnica NT 712) em rotação a 90 rpm, por 24h, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, foram coletados, assepticamente, 3 mL dessas culturas para se determinar a densidade óptica (DO), a 600 nm. Todas as amostras de bacterianas tiveram sua DO equiparada por meio de diluição com solução salina (0,85%). Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de cada uma das diluições foram inoculados em meio MS, adicionado com fontes de fosfato separadamente.

Os fungos foram crescidos em meio BDA (infusão de 200 g de batata, dextrose 20 g e ágar 15 g), por três dias, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial foram inoculados em tubos de ensaio (um disco por tubo), contendo meio MS, adicionado das fontes de fosfato separadamente. As culturas permaneceram incubadas sob agitação constante (90 rpm), a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 72h. A solubilização de  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  foi avaliada em espectrofotômetro em absorbância a 725 nm.

### 2.2. Curva de calibração dos fosfatos de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ )

Uma solução estoque de ácido fosfórico foi preparada a  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . A partir dessa solução, retiraram 0, 100, 200, 300, 500, 700 e 900  $\mu\text{L}$  e água destilada foi adicionada até completar o volume final de 1 mL, obtendo assim as concentrações crescentes para construção da curva de calibração de fósforo (P).

Posteriormente, foram adicionados 9 mL do reagente de trabalho [0,4g de vitamina C; 100 mL da solução 725 (1,0 g de subcarbonato de bismuto; 68 mL de ácido sulfúrico; 300 mL de água destilada/20 g de molibdato de amônio; 68 mL de ácido sulfúrico/completar para 1000 mL em balão volumétrico); 900mL de água destilada], em todos os tubos da curva-padrão. Em seguida, os tubos foram agitados e mantidos em repouso, por 20 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (725 nm) em absorbância.

### **2.3. Curva de solubilização de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) por isolados bacterianos e fúngicos**

Os isolados bacterianos e fúngicos, crescidos em meio de cultura MS enriquecido separadamente com as fontes de fosfato  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ , após 72h, foram centrifugados (8.000 rpm, por 10 min a 10 °C). Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 9 mL do reagente de trabalho. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso, por 20 minutos e feita a leitura em espectrofotômetro a 725 nm de absorbância. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Como controle, utilizou-se o meio MS, adicionado separadamente de fontes de fosfato. A solubilização de  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  foi determinada utilizando a equação da curva padrão e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%).

### **2.4. Quantificação de produção de ácido indolacético (AIA) por microrganismos isolados de solo de mangabeira**

As bactérias foram crescidas em 10 mL de meio de cultura DYGS (glicose 2,0 g; peptona 1,5 g; extrato de levedura 2,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g (RODRIGUEZ NETO et al., 1986), por 24h a 30 °C, sob agitação constante (90 rpm), com o auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712). Posteriormente, foram coletados, assepticamente, 3 mL dessas culturas para se determinar a DO a 600 nm. Todas amostras tiveram sua DO equiparada através de diluição com solução salina (0,85%). Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de cada uma das diluições foi inoculada em meio DYGS, suplementado com 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de triptofano (DA SILVEIRA, 2008).

Os fungos foram crescidos em meio BDA, por 3 dias, a 30 °C. Posteriormente, utilizando o fundo de ponteiras de 1000 µL, foram obtidos discos com 5 mm de diâmetro. Tais discos foram inoculados em tubos de ensaio (um disco por tubo), contendo meio DYGS suplementado com 100 µg mL<sup>-1</sup> de triptofano. Em seguida, as culturas permaneceram incubadas sob agitação constante (90 rpm), a 30 °C, por 72h. A produção de AIA foi avaliada por meio do método colorimétrico, descrito por Gordon e Weber (1951).

### **2.5. Curva de calibração de ácido indolacético (AIA)**

Uma solução estoque de AIA (Sigma<sup>®</sup>) foi preparada a 10 mM (1,75 mg mL<sup>-1</sup>). Essa solução foi diluída em água destilada, em concentrações crescentes (0, 1, 3, 5, 7, 10, 25, 50, 100 e 150 µg mL<sup>-1</sup>) para a construção da curva de calibração de AIA, empregando o método descrito por Sarwar e Kremer (1995).

Foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada diluição e transferida para tubos de ensaio, sendo adicionado 2 mL do reagente Salkowski (1 mL de FeCl<sub>3</sub> – 1,35g/10 mL; 50 mL de HClO<sub>4</sub> – 35%). Em seguida, os tubos foram mantidos no escuro, por 30 min (HARTMANN et al., 1983). A coloração rósea foi o indicativo da presença do hormônio, sendo quantificada pela leitura em espectrofotômetro (530 nm) em absorbância.

### **2.6. Curva de produção de ácido indolacético (AIA) pelos isolados bacterianos e fúngicos**

Os isolados bacterianos e fúngicos crescidos em meio DYGS enriquecido com triptofano, após 72h, foram centrifugados (10.000 rpm), por 10 min, a 10 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, sendo adicionado 2 mL do reagente Salkowski. Os tubos foram mantidos no escuro, por 30 min e em seguida feita a leitura em espectrofotômetro a 530 nm em absorbância. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. Como controle, foi utilizado o meio de cultura DYGS com triptofano. A concentração de AIA foi determinada utilizando a equação da curva padrão e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Quantificação da solubilização em meio líquido de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ )

A maior taxa de solubilização de  $\text{AlPO}_4$  foi atingida pelo isolado MC1 (1359,60  $\text{mg L}^{-1}$ ) e as menores taxas pelo MA2 e MF4, com valor médio de 922,27 e 946,26  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1).

Para a solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ , os isolados MC1, MC2, MA5 e MF4 demonstraram maior potencial em meio líquido (1575,22; 1442,44; 1505,22 e 1428,56  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente) (Tabela 1). O isolado MC2 possibilitou maior solubilização de  $\text{FePO}_4$  em meio líquido, quando comparado com os outros isolados, com valor médio 2237,93  $\text{mg L}^{-1}$  (Tabela 1).

Entre as fontes de fosfatos, todos os isolados solubilizadores das três fontes fosfatadas demonstraram as maiores médias de solubilização em meio líquido contendo  $\text{FePO}_4$ . Similarmente, o MF4 e MA5 também demonstraram valores altos quando  $\text{CaHPO}_4$  foi utilizado (Tabela 1).

**Tabela 1.** Solubilização *in vitro* de fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ), cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4$ ) por microrganismos obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Rio Verde – GO, 2012.

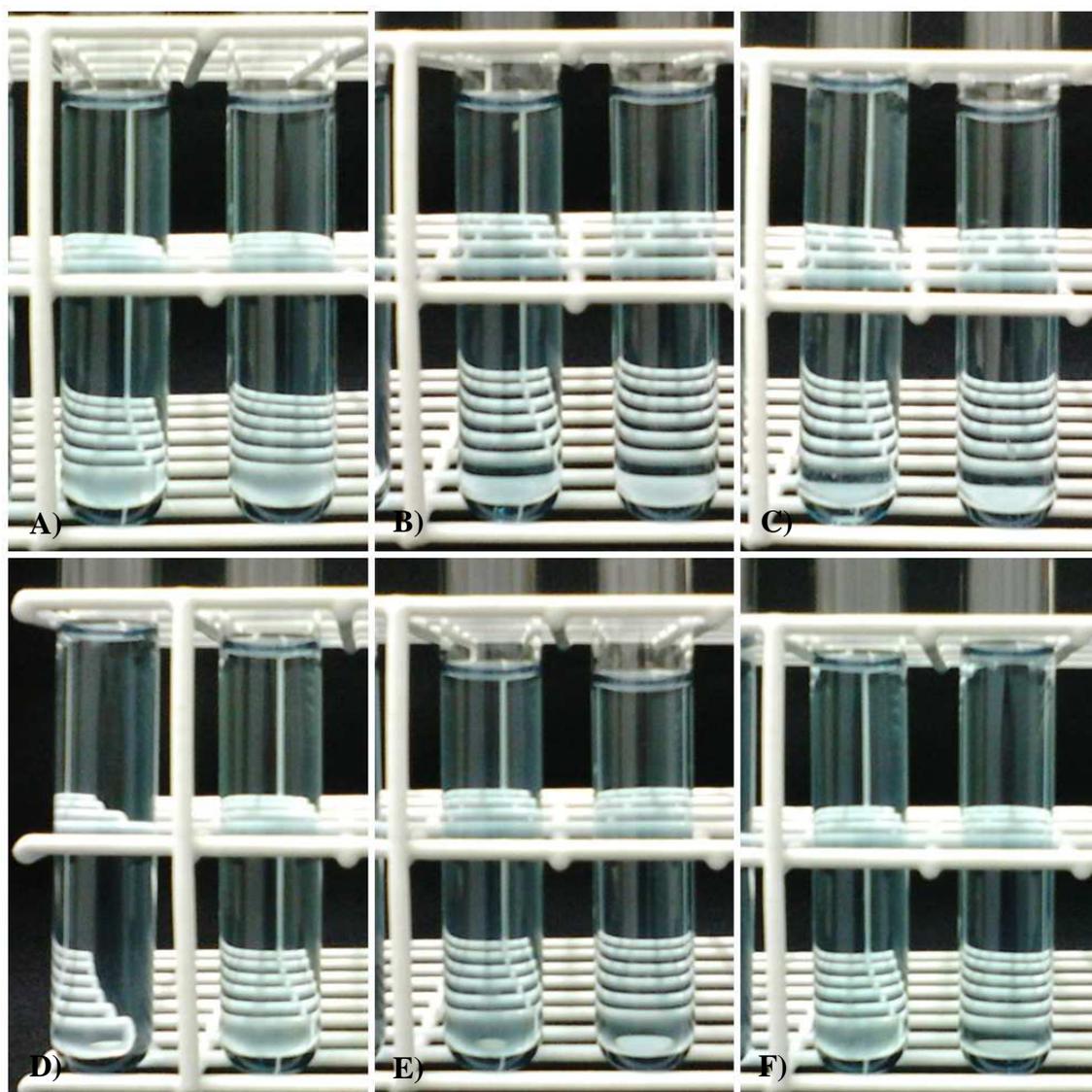
	Isolados	[ ] de $\text{AlPO}_4$	[ ] de $\text{CaHPO}_4$	[ ] de $\text{FePO}_4$
		----- $\text{mg L}^{-1}$ -----		
Solubilizadores de $\text{CaHPO}_4$	MC1	1359,60 Ac	1575,22 Ab	1705,93 Ea
	MC2	1022,93 Cc	1442,44 Ab	2237,93 Aa
Solubilizadores de $\text{AlPO}_4$	MA1	1054,93 Bb	1050,22 Cb	1647,27 Ea
	MA2	922,27 Dc	1129,67 Cb	1467,93 Ga
	MA3	864,27 Ec	1188,56 Bb	1538,60 Fa
	MA4	904,93 Ec	1274,67 Bb	1557,93 Fa
	MA5	1060,27 Bb	1505,22 Aa	1437,93 Ga
	MA6	1032,93 Bb	1102,44 Cb	1690,60 Ea
Solubilizadores de $\text{FePO}_4$	MF1	896,93 Ec	1034,11 Cb	1371,27 Ha
	MF2	886,93 Eb	1152,45 Ca	1109,93 Ia
	MF3	1050,93 Bc	1195,78 Bb	1572,60 Fa

MF4	946,26 Db	1428,56 Aa	1355,93 Ga
MF5	1033,60 Bb	1108,56 Cb	1864,60 Da
MF6	1002,93 Cb	1265,78 Bb	1982,60 Ca
MF7	994,93 Cc	1186,33 Bb	2093,27 Ba

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

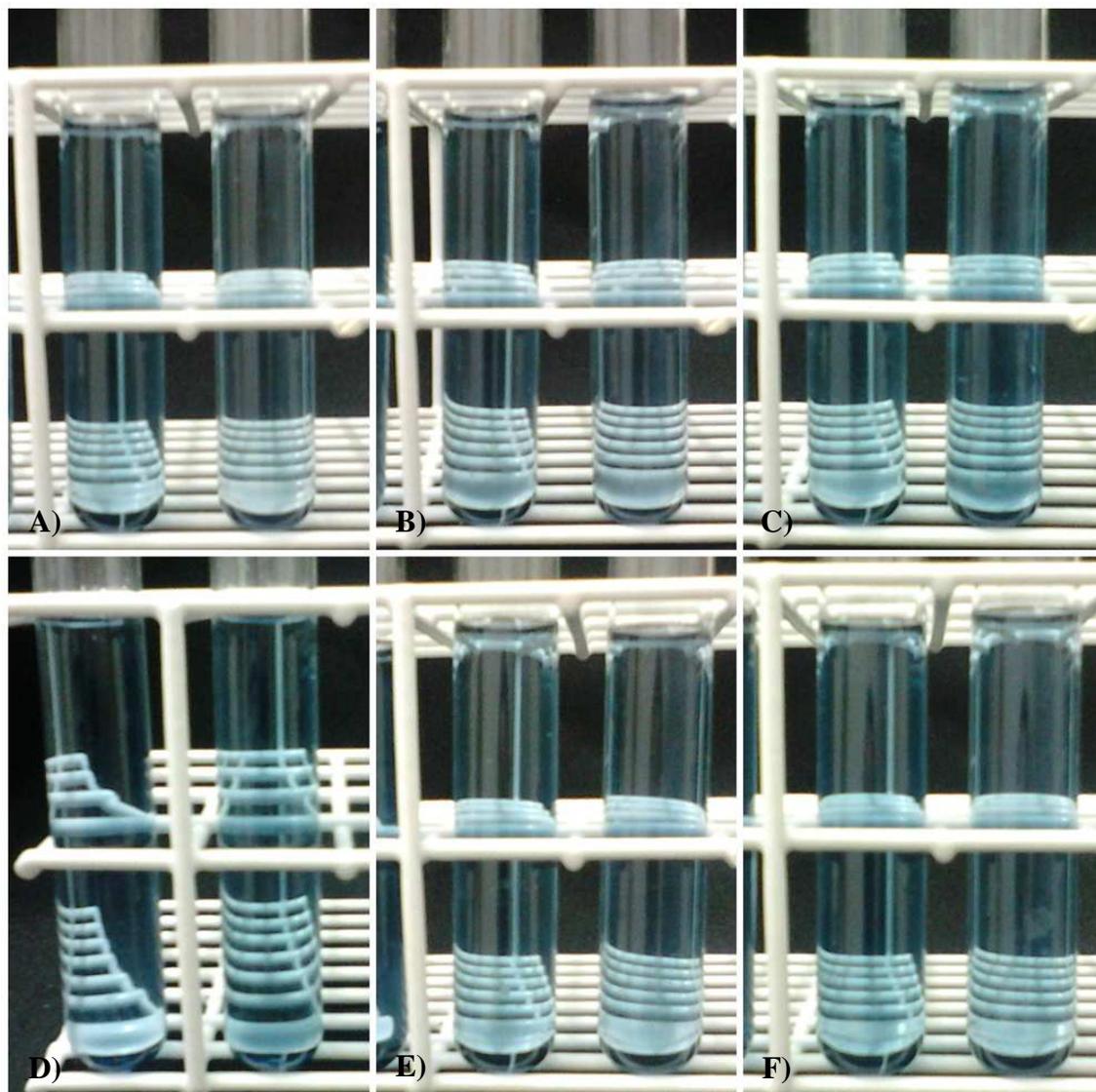
[ ] concentração

A intensidade da coloração azul foi o indicativo para alta ou baixa solubilização das fontes de fosfato em meio líquido (Figura 1A, 1B, 1C, 1D, 1E e 1F). Na solubilização de  $AlPO_4$ , o isolado MC1 atingiu o maior valor e, conseqüentemente, a coloração mais azul escura, sendo o indicativo de alta solubilização (Figura 1F).



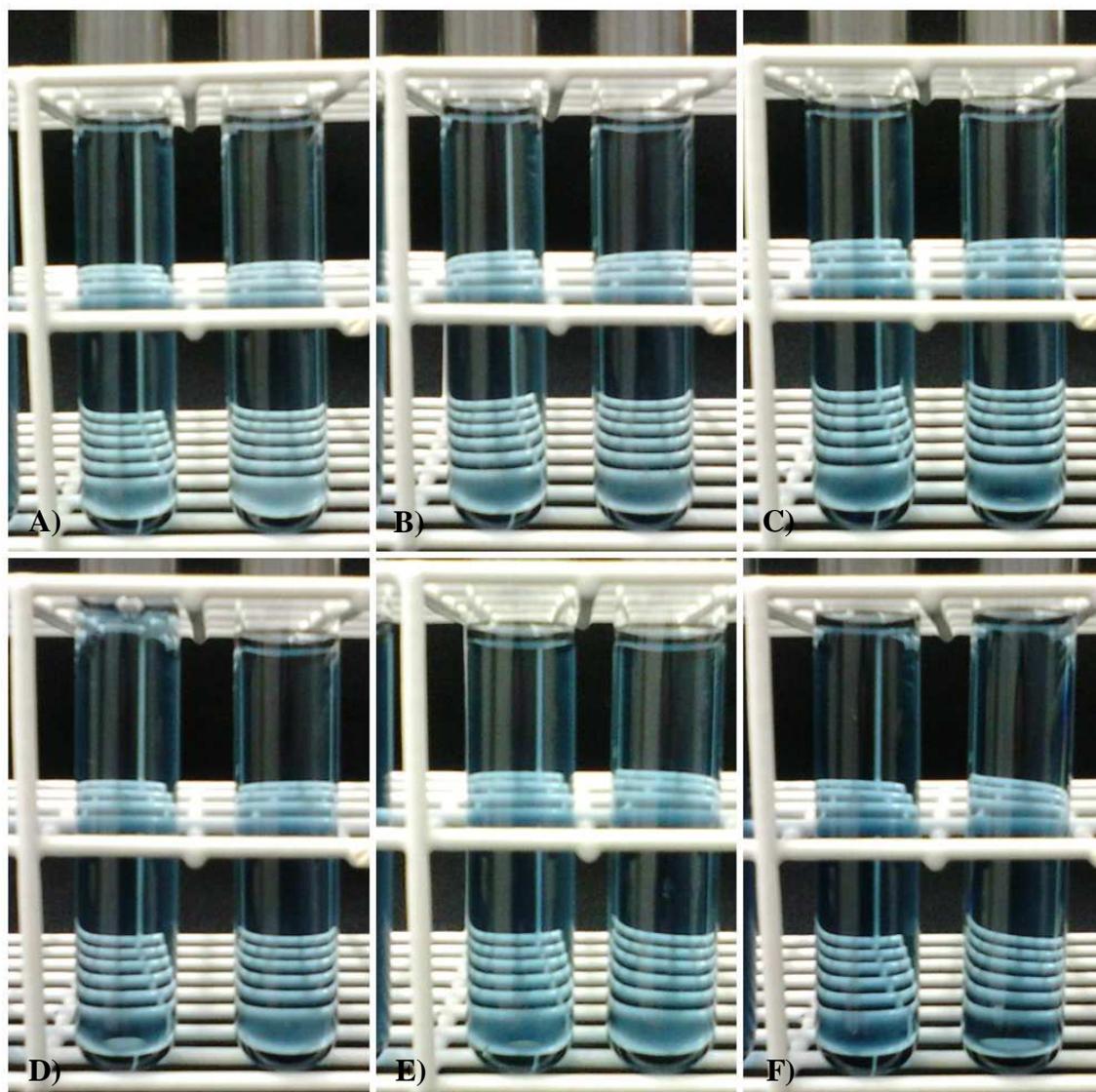
**Figura 1.** Solubilização de fosfato de  $AlPO_4$  por isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Isolados: A) MA6; B) MF5; C) MF3; D) MA1; D) MA5; E) MC1. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012.

Para a solubilização  $\text{CaHPO}_4$ , os isolados MF4, MC2, MF7 e MC1 atingiram as maiores médias para a solubilização, possibilitando coloração azul mais escura (Figura 2C, 2D, 2E e 2F).



**Figura 2.** Solubilização de fosfato de  $\text{CaHPO}_4$  por isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Isolados; A) MF6; B) MA4; C) MF4; D) MC2; E) MA5; F) MC1. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012.

Avaliando a solubilização de  $\text{FePO}_4$ , o isolado MC2 atingiu maior valor médio ( $2237,93 \text{ mg L}^{-1}$ ), diferentemente do isolado MF6 que atingiu valor médio baixo ( $1647,27 \text{ mg L}^{-1}$ ), conseqüentemente, sendo notada uma coloração azul clara (Figura 3A e 3F).



**Figura 3.** Solubilização de fosfato  $\text{FePO}_4$  por isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Isolados: A) MA1; B) MC1; C) MF5; D) MF6; E) MF7; F) MC2. Fotos; Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012.

Avaliando a capacidade de solubilização de 88 isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos e álicos Hara e Oliveira (2004) observaram que 39% deles solubilizaram  $\text{CaHPO}_4$  e 67% solubilizaram  $\text{AlPO}_4$ . Chagas Junior et al. (2010), avaliando a capacidade de solubilização de 208 isolados rizóbios constataram que 68 solubilizaram  $\text{CaHPO}_4$ , 47 solubilizaram  $\text{AlPO}_4$  e 32 solubilizaram ambas as fontes.

Portanto, para a solubilização de  $\text{AlPO}_4$ , o isolado MC1 foi mais eficiente, enquanto para solubilização de  $\text{FePO}_4$  o isolado MC2 atingiu maiores valores de solubilização de fosfato em meio líquido. Para a solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ , os isolados MC1, MC2, MA5 e MF4 foram os que apresentaram maior potencial.

Entre as fontes de fosfato, todos os isolados mostraram maior capacidade de solubilização de  $\text{FePO}_4$ , a exceção dos isolados MF4 e MA5 que também demonstraram alta capacidade de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ .

### 3.2. Quantificação de produção de ácido indolacético (AIA) por microrganismos isolados de solo de mangabeira

Entre os isolados rizosféricos, a maior produção de AIA foi atingida pelo MF6 ( $49,96 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sendo que os menores valores foram atingidos pelos isolados MF4, MA3, MA6 e MC1, com 19,47; 19,49; 20,01 e  $20,08 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 2).

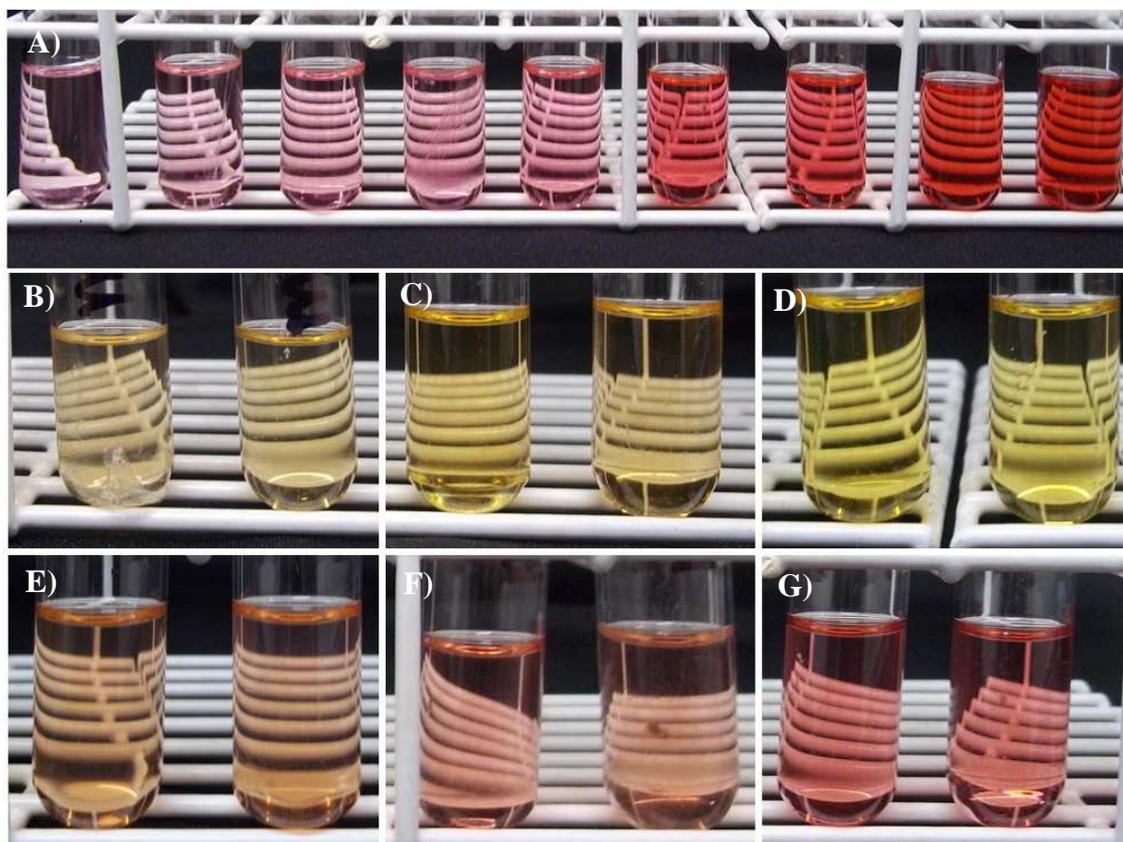
**Tabela 2.** Produção *in vitro* de ácido indolacético (AIA) por microrganismos obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Rio Verde – GO, 2012.

	Isolados	[ ] de AIA $\mu\text{g L}^{-1}$
Solubilizadores de $\text{CaHPO}_4$	MC1	20,08 G
	MC2	20,90 F
Solubilizadores de $\text{AlPO}_4$	MA1	20,73 F
	MA2	33,63 B
	MA3	19,49 G
	MA4	20,60 F
	MA5	20,33 F
	MA6	20,01 G
Solubilizadores de $\text{FePO}_4$	MF1	20,23 F
	MF2	22,53 D
	MF3	30,34 C
	MF4	19,47 G
	MF5	22,90 D
	MF6	49,96 A
	MF7	21,57 E

Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

[ ]= concentração.

A intensidade da coloração rósea, induzida por cada isolado, foi o indicativo de maior ou menor produção de AIA. O isolado MF2 promoveu coloração clara, com valor médio de produção de AIA de  $22,53 \mu\text{g L}^{-1}$ . Já o isolado MF6 induziu a uma coloração escura, com valor de  $49,96 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 4).



**Figura 4.** Produção *in vitro* de ácido indolacético (AIA) por isolados obtidos de solo de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). A) Curva padrão; B) isolado MF2; C) isolado MF5; D) isolado MF7; E) isolado MF3; F) isolado MA2; G) isolado MF6. Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012.

Por meio do método colorimétrico, Kuss et al. (2007) observaram a produção de  $41,09 \mu\text{mL}^{-1}$  de AIA por *Azospirillum brasiliense*. Similarmente, Pedrinho et al. (2010) observaram que dos 58 isolados oriundos de raízes de milho, 18 foram positivos no método colorimétrico para detectar a produção desse fitormônio. Neste trabalho, o isolado MF6 atingiu maior produção *in vitro* do fitormônio AIA.

#### 4. CONCLUSÕES

Maiores taxas de solubilização, em meio líquido, para  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$  foram obtidas pelos isolados MC1 e MC2, respectivamente. Para  $\text{CaHPO}_4$ , os isolados MC1, MC2, MA5 e MF4 atingiram as maiores médias.

Entre as fontes fosfatadas, todos os isolados atingiram os maiores valores quando o meio de cultura líquido estava suplementado com  $\text{FePO}_4$ .

Todos os isolados produziram AIA, porém a maior produção foi obtida pelo isolado MF6.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVEIRA, A. N. de; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

DA SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactéria promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. 2008. 83p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GORDON, S. A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**, v. 26, p.192-195, 1951.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 343-357, 2004.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v. 29, p. 916-923, 1983.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras. Editora UFLA, 729 p., 2006.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. de M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

RADWAN, T. E. S. E. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 997-1004, 2005.

RADWAN, T. E. S. E. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum e Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004.

RODRIGUEZ NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A; VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p.16, 1986.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 282-285, 1995.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S.; **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agrônomo, Campinas-SP. 2007. 312 p.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Ciência do Solo. Lavras-MG, 818 p., 1999.

## CAPÍTULO VIII

### INOCULAÇÃO *IN VITRO* DE MICRORGANISMOS RIZOSFÉRICOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO EM PLÂNTULAS DE MANGABEIRA

#### RESUMO

O uso de microrganismos promotores do crescimento de plantas, durante a micropropagação, tem sido recomendado pelos efeitos benéficos, como aumento da área foliar, número de folhas e matéria seca, com redução do tempo de aclimatização e maior sobrevivência das mudas, após seu transplante. A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera de grande potencial para exploração econômica, encontrada naturalmente no Brasil. Objetivou-se com esse trabalho, avaliar a inoculação *in vitro* de diferentes isolados bacterianos e fúngicos e métodos de inoculação no crescimento de plântulas de mangabeira. No ensaio 1, foram avaliadas a inoculação de isolados rizosféricos em plântulas de mangaba, em frascos, sob condições *in vitro*. No ensaio II, testou-se a inoculação de isolados rizosféricos na promoção do crescimento de plântulas de mangaba sob condições *in vitro*, utilizando tubos de ensaio. Em ambos os ensaios, utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso. Após 30 dias, foram avaliadas as seguintes características: comprimento médio das plântulas (cm), número médio de folhas expandidas, gemas, brotações laterais e porcentagem de enraizamento. O isolado MF6 proporcionou maior número de gemas e folhas expandidas com as plântulas cultivadas em frascos. Maior comprimento médio de parte aérea e número de gemas foi obtido com a inoculação do isolado MF4, em tubos de ensaio. Para o cultivo de plântulas de mangaba foi adequado a inoculação do isolado MF6 em frascos, por proporcionar maior crescimento das plântulas.

**Palavra-chaves:** *Hancornia speciosa* Gomes, fitormônio, micropropagação.

## CHAPTER VIII

### ***IN VITRO* INOCULATION OF GROWTH PROMOTERS RHIZOSPHERIC MICROORGANISMS IN SEEDLINGS OF MANGABEIRA**

#### ABSTRACT

The use of growth promoters microorganisms of plants during micropropagation is recommended by its beneficial effects such the increased of leaf area, leaf number and dry matter with reducing of the acclimatization time and higher survival after transplantation. Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) is a fruit of great potential for economic exploitation, found naturally in Brazil. This work aimed to evaluate the *in vitro* inoculation of different isolates of bacterial and fungal and inoculation methods in the growth of *H. speciosa* seedlings. In test 1, was evaluated the inoculation of rhizosphere isolates in mangaba seedlings, in vials, under *in vitro* conditions. In test II was tested the inoculation of rhizosphere isolates in growth promoting of mangaba seedlings under *in vitro* conditions using test tubes. In both trials, there used a completely randomized design. After 30 days, were evaluated the following characteristics: average length of seedlings (cm), average number of expanded leaves, buds, lateral shoots and rooting percentage. The strain MF6 had a higher number of buds and expanded leaves in seedlings grown in vials. The highest average length of shoot and bud number were obtained by inoculation of the isolate MF4, in test tubes. For cultivation of mangaba seedling was ideal the inoculation of MF6 isolate in vials, by having a higher seedlings growth.

**Key words:** *Hancornia speciosa*, phytohormone, micropropagation

## 1. INTRODUÇÃO

A mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) pertence à família Apocynaceae, sendo uma frutífera com grande potencial para exploração econômica, encontrada naturalmente no Brasil, cuja distribuição ocorre em áreas da caatinga, cerrado, mata atlântica e floresta amazônica. Seus frutos são muito apreciados, pelo seu ótimo aroma, sabor e digestibilidade, podendo ser consumidos *in natura* ou processados na forma de sorvete, pudim, geleia, vinho, vinagre, xarope e licor (ENDRINGER et al., 2009; BARROS et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Sua madeira é utilizada na carpintaria para confecção de caixas e para produção de carvão, látex é utilizado para fins ornamentais e pode ser usado em aplicações comerciais (VIEIRA et al., 2006; SOARES et al., 2007; BARROS et al., 2010).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) colonizam diferentes órgãos vegetais e exercem efeitos benéficos, podendo promover aumentos na taxa de germinação de sementes, no desenvolvimento de órgãos, na produção de flores e no rendimento das culturas, em casa de vegetação e no campo (SANTOS et al., 2005). A liberação de exsudados pelas raízes cria uma zona rizosférica rica em energia, que favorece a mineralização/solubilização dos nutrientes em compostos disponíveis para imediata absorção pelas raízes. Alguns modos de ação das RPCP são relatados pela maioria dos pesquisadores, como a produção de fitormônios, o controle biológico de fitopatógenos, a fixação assimbiótica ou a interferência na fixação simbiótica de nitrogênio e a solubilização de fosfatos (FREITAS & VILDOSO, 2004; SILVEIRA & FREITAS, 2007; ARAUJO, 2008).

A utilização de RPCP durante a micropropagação de plantas tem sido recomendada, entre os efeitos benéficos está o aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos, maior promoção de crescimento e aumento da resistência a patógenos no transplante, aumento da área foliar, número de folhas e matéria seca, implicando em redução do tempo de aclimatização e maior sobrevivência das mudas após o transplante (MARIANO et al., 2004; SANTOS et al., 2005).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a inoculação *in vitro* de diferentes isolados bacterianos e fúngicos e métodos de inoculação no crescimento de plântulas de mangabeira.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Microbiologia Agrícola do IF Goiano - Campus Rio Verde, GO. Foram avaliados 15 isolados (12 fungos e três bactérias) obtidos de solo de mangabeira, como descrito no Capítulo VI.

### 2.1. Material vegetal

As plântulas utilizadas eram provenientes de sementes preestabelecidas *in vitro*, obtidas de frutos coletados em janeiro de 2011, na Fazenda Gameleira, localizada no município de Montes Claros de Goiás – GO (16° 06' 20'' S – 51° 17' 11'' W), a 592 m de altitude.

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 20 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com a metade da concentração original dos sais (MS-50%), mais as vitaminas propostas por White (1943), 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica®). O pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem. Após a inoculação, as sementes foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de 25±3 °C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, permanecendo para fornecer plântulas preestabelecidas *in vitro*, para implantação dos ensaios.

As plântulas obtidas foram repicadas, utilizando como explantes segmentos nodais com 2 cm de comprimento e duas gemas laterais, e mantidas em tubos de ensaio contendo meio de cultivo WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), com a metade da concentração original dos sais (WPM-50%). As culturas permaneceram em sala de crescimento, por 30 dias, sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25±3 °C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. A substituição do meio MS-50% pelo WPM-50% ocorreu pelos experimentos anteriores.

### 2.2. Ensaio I – Inoculação de isolados bacterianos e fúngicos em frascos para promoção do crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira

Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo nutriente (extrato de carne, 3 g e peptona, 5 g), *over night*, a 30 °C, sob agitação constante (90 rpm), com o auxílio

de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712). Posteriormente, alíquotas de 15  $\mu\text{L}$  das culturas foram inoculadas nas proximidades das plântulas de mangaba preestabelecidas em meio de cultivo WPM-50%. Como controle, foi inoculado 15  $\mu\text{L}$  de caldo nutriente axênico.

Os isolados fúngicos cresceram em BDA sólido (infusão de 200g de batata, dextrose 20g e ágar 15g), suas colônias foram fragmentadas utilizando o fundo de ponteiros de 1000  $\mu\text{L}$ . Foram obtidos discos com 5 mm de diâmetro, que foram inoculados nas proximidades do colo de plântulas de mangaba que cresciam em frascos com meio WPM - 50%. Como controle, foram utilizados discos de BDA.

Frascos contendo plântulas sem inoculação foram utilizados como controle total. Após a inoculação, os frascos com as plântulas foram mantidos em BOD, a 15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de radiação fotossinteticamente ativa, temperatura média de 28 °C e fotoperíodo de 16 horas.

As plântulas foram avaliadas diariamente, sendo que as inoculadas com os isolados fúngicos foram avaliadas até o 15º dia de inoculação e as inoculadas com os isolados bacterianos, até o 20º dia de inoculação. Foi avaliado comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (cm), número médio de folhas expandidas, gemas, brotações laterais e porcentagem de enraizamento.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 18 tratamentos e 10 repetições, cada uma constituída por um frasco, totalizando 180 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Scott-Knott (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

### **2.3. Ensaio II - Inoculação de isolados bacterianos e fúngicos em tubos de ensaio para promoção do crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira**

Os isolados fúngicos e bacterianos cresceram em meio líquido GL (glicose 10 g; extrato de levadura 2 g e ágar 15 g), conforme Sylvester-Bradley et al. (1982). e caldo nutriente, respectivamente, por 72h, a 30 °C sob agitação constante (90 rpm), com o auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712). Posteriormente, foram centrifugados a 5000 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro estéril, em capela de fluxo vertical.

Para cada isolado foi utilizado, separadamente, 20 mL<sup>-1</sup> do sobrenadante obtido, que foi adicionado ao meio de cultivo WPM-50%, após sua autoclavagem, em capela de fluxo laminar horizontal. Após a solidificação do meio de cultivo, os segmentos nodais foram inoculados e mantidos sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de 25±3 °C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de 45-55 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

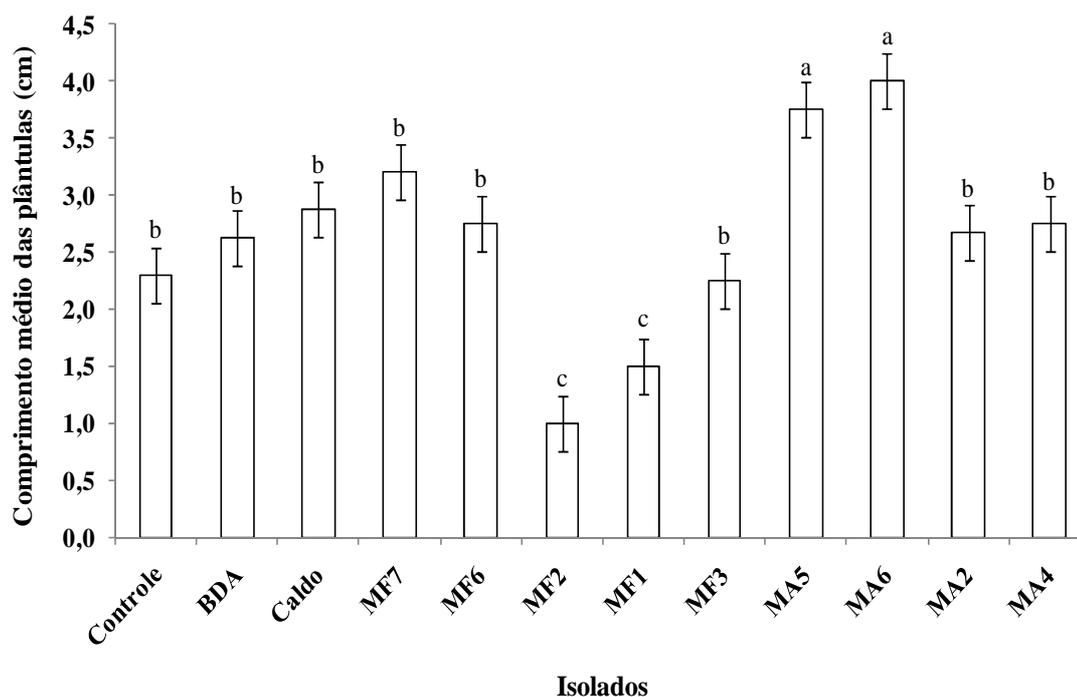
As plântulas foram avaliadas diariamente e, ao final de 30 dias, foi avaliado comprimento médio das plântulas (desconsiderando as raízes quando ocorreram) (cm), número médio de folhas expandidas, gemas, brotações laterais e porcentagem de enraizamento.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 15 tratamentos e 15 repetições, cada uma constituída por um frasco, totalizando 225 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Scott-Knott (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

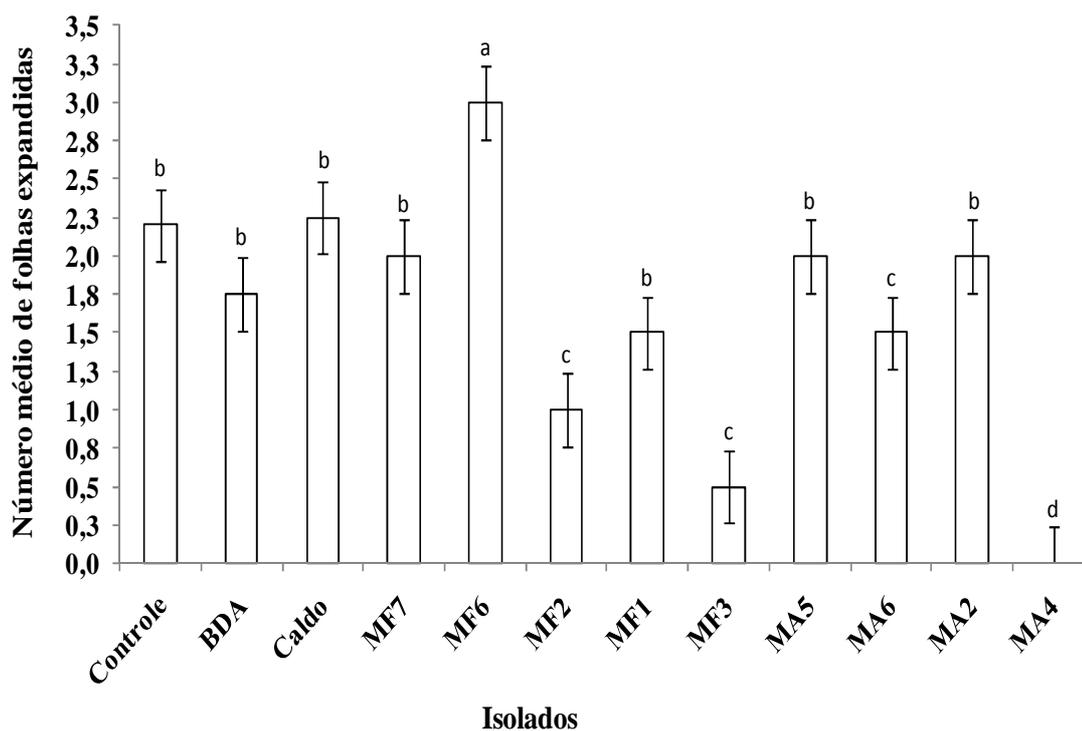
#### **3.1. Ensaio I – Inoculação de isolados bacterianos e fúngicos em frascos para promoção do crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira**

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, os isolados MA6 e MA5 proporcionaram maior comprimento médio das plântulas de mangabeira, com valores médios de 4,0 e 3,75 cm, respectivamente. As médias mais baixas foram obtidas com a inoculação dos isolados MF2 e MF1 (1,00 e 1,5 cm, respectivamente) (Figura 1).



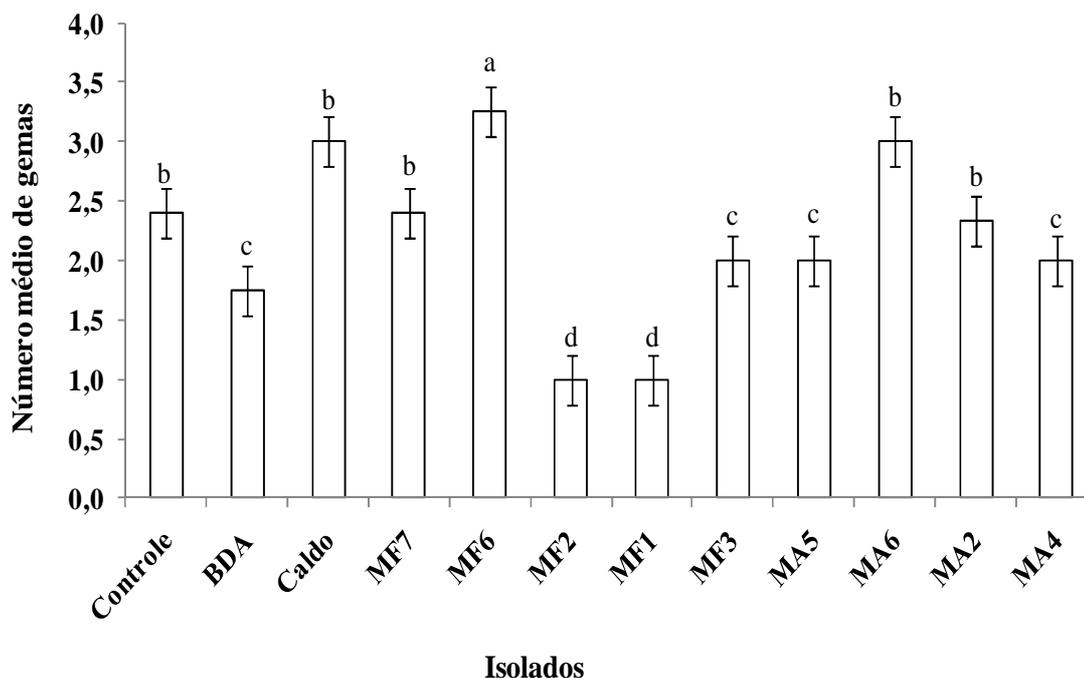
**Figura 1.** Comprimento médio das plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em frascos contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

O isolado MF6 proporcionou maior número médio de folhas expandidas. Contrariamente, as plântulas inoculadas com os isolados MF3 e MF2 produziram menor número de folhas. O isolado MA4 influenciou negativamente a produção de folhas expandidas, não ocorrendo formação destas (Figura 2).



**Figura 2.** Número médio de folhas expandidas de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em frascos contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Quanto ao número de gemas, verificou-se o mesmo resultado obtido para número de folhas expandidas, ou seja, a inoculação do isolado MF6 proporcionou maior número médio de gemas. Já as plântulas inoculadas com os isolados MF2 e MF1 produziram as menores médias (Figura 3).



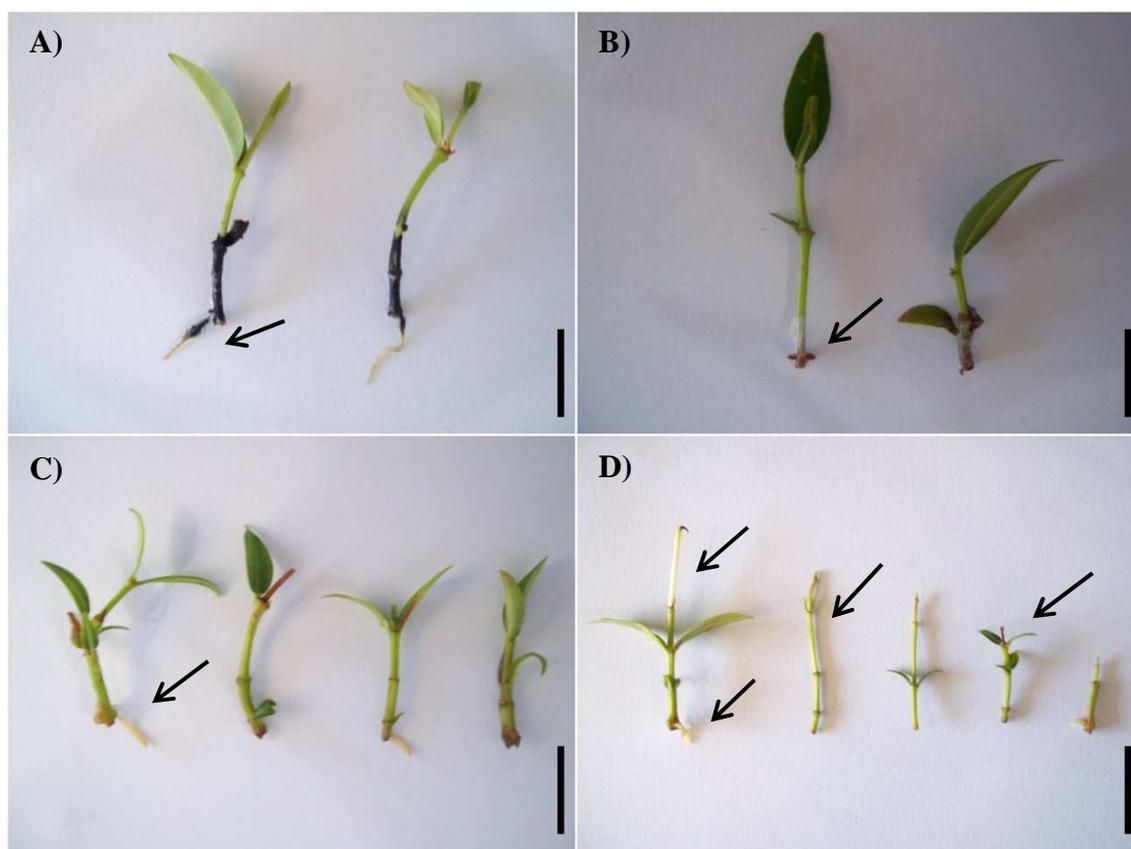
**Figura 3.** Número médio de gemas de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em frascos contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Os isolados não exerceram influência para número de brotações laterais e porcentagem de enraizamento. Visualmente, foi observado que plântulas inoculadas com o isolado MA6 eram despigmentadas (verde-claro), com formação de raízes adventícias (Figura 4A).

Plântulas inoculadas com o isolado MA5 eram de coloração verde-escura, característica da espécie, com folhas expandidas maiores, comparadas aos demais tratamentos e ocorreu início da formação de raízes adventícias (Figura 4B).

A inoculação do isolado MF6 proporcionou coloração verde-clara as plântulas, sendo que essas eram menores, comparadas às obtidas com a inoculação do MA6 e MA5. Também, foi constatada a formação de raízes adventícias (Figura 4C).

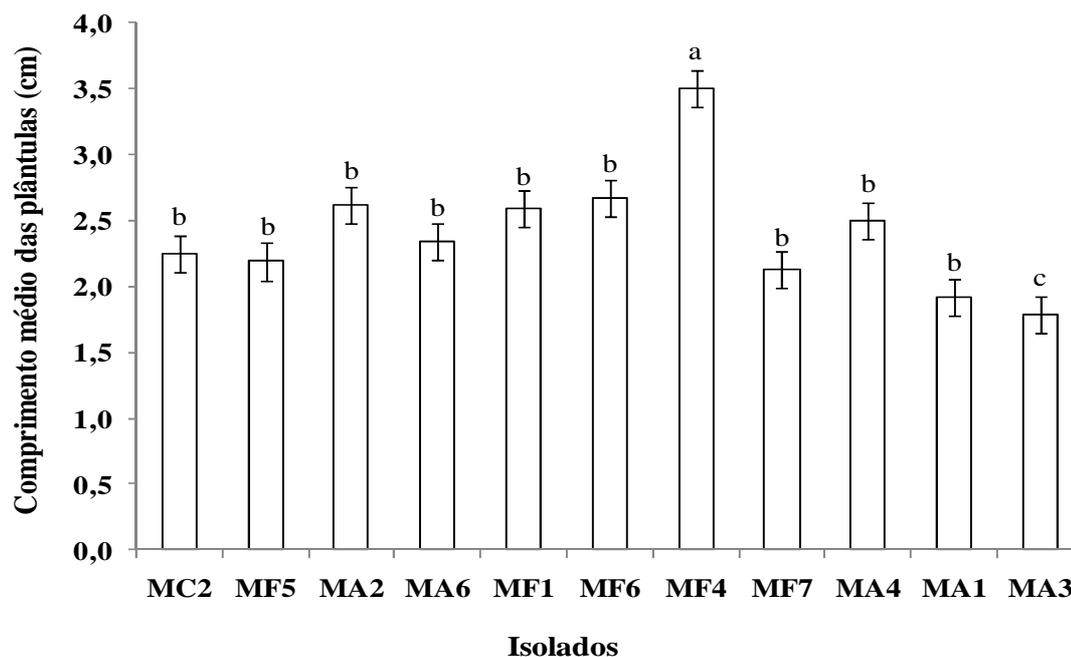
As folhas expandidas das plântulas inoculadas com o isolado MF7 eram menores, comparadas às obtidas com a inoculação do MA5. As plântulas eram quase totalmente despigmentadas (branco), estioladas e finas. Houve formação de raízes adventícias (Figura 4D).



**Figura 4.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro* em frascos contendo meio WPM-50%, após inoculação de isolados bacterianos e fúngicos. Tratamentos: A) isolado MA6; B) isolado MA5; C) isolado MF6; D) isolado MF7. Formação de raízes adventícias, caule despigmentado, plântula estiolada e folhas expandidas pequenas (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra = 10mm.

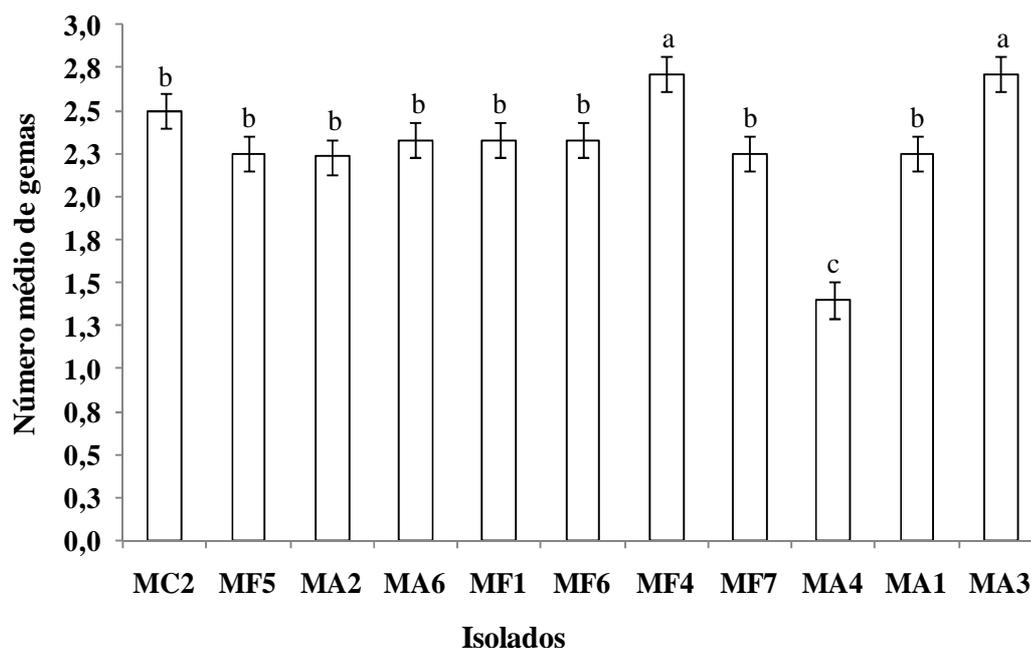
### 3.2. Ensaio II - Inoculação de isolados bacterianos e fúngicos em tubos de ensaio para promoção do crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira

O isolado MF4 proporcionou maior comprimento médio das plântulas (3,5 cm). Quando as plântulas foram inoculadas com o isolado MA3, foi obtido o menor valor médio (1,78 cm) (Figura 5).



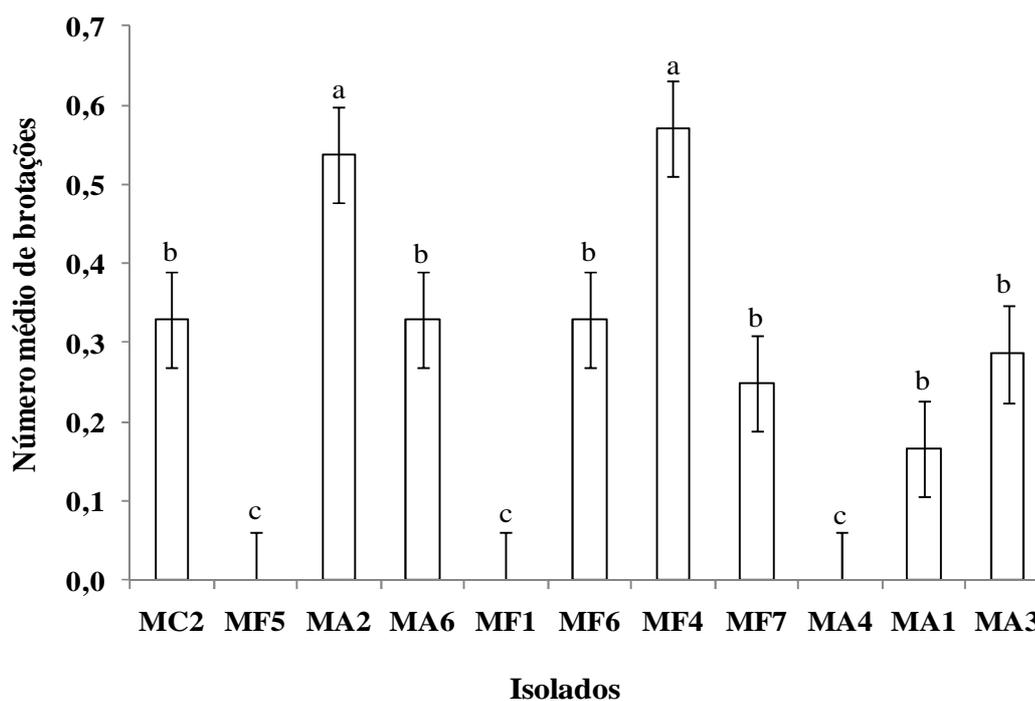
**Figura 5.** Comprimento médio das plântulas (cm) de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em tubos de ensaio contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

O isolado MF4 também proporcionou maior número médio de gemas, em que o menor valor médio foi obtido com a inoculação do MA4 (Figura 6).



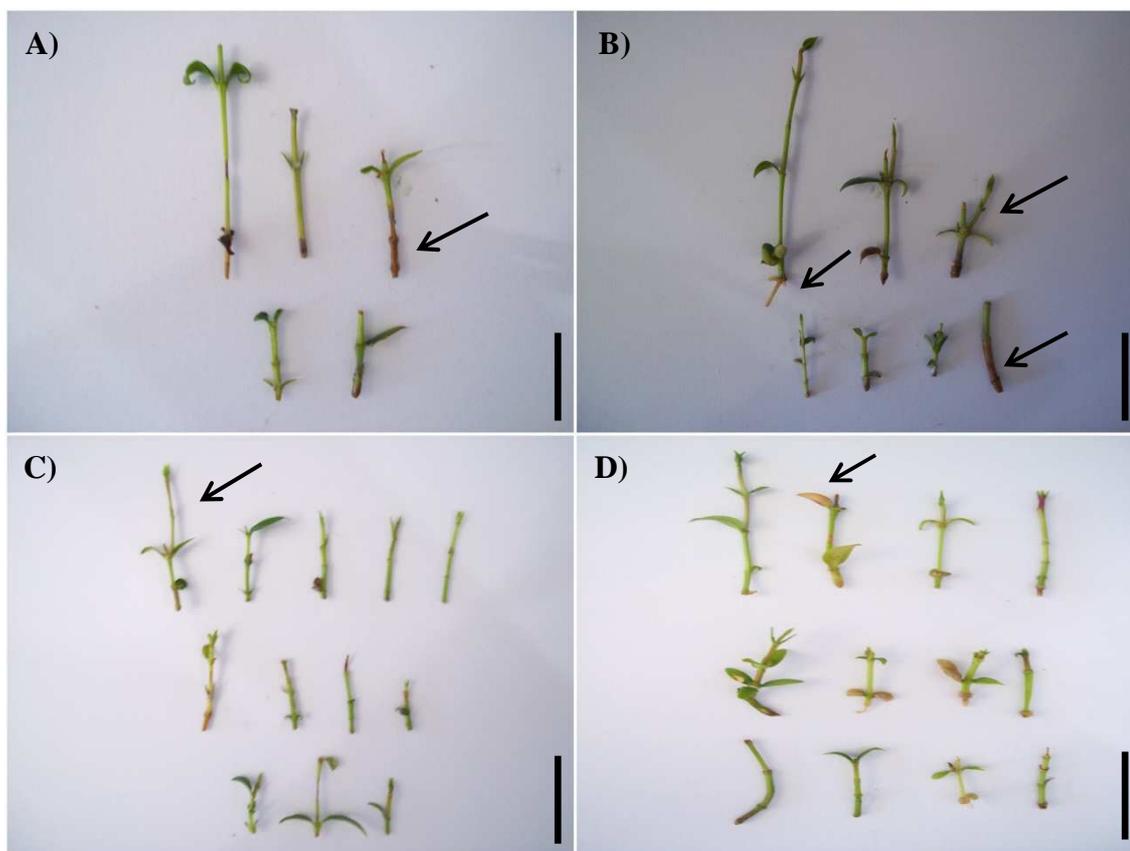
**Figura 6.** Número médio de gemas de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em tubos de ensaio contendo meio WPM-50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Plântulas inoculadas com os isolados MF4 e MA2 tiveram maior número médio de brotações laterais. Já a inoculação dos isolados MF5, MF1 e MA4 não proporcionou formação de brotações (Figura 7).



**Figura 7.** Número médio de brotações de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), inoculadas com isolados bacterianos e fúngicos e cultivadas em tubos de ensaio contendo meio WPM – 50%. Rio Verde – GO, 2012. Médias seguidas pela mesma, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Os isolados não exerceram influência quanto ao número de folhas e porcentagem de enraizamento. Visualmente, foi observado, aos 30 dias, que plântulas inoculadas com o MF4 eram de coloração verde-clara, com pouca formação de folhas expandidas e não foi constatada formação de raízes adventícias (Figura 8A).



**Figura 8.** Plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em tubos de ensaio contendo meio WPM-50%, após inoculação de isolados bacterianos e fúngicos. Tratamentos: A) isolado MF4; B) isolado MA3; C) isolado MA2; D) isolado MF6. Necrose na base da plântula, raízes adventícias, brotações laterais, plântula estiolada e folha senescente (seta). Fotos: Cabral, 2012. Rio Verde – GO, 2012. Barra = 10 mm.

Quando ocorreu a inoculação do isolado MA3, algumas plântulas eram pequenas, com formação de folhas expandidas rudimentares de coloração verde-escura. Em algumas plântulas, ocorreu necrose na base destas e formação de raízes adventícias (Figura 8B).

As plântulas inoculadas com o isolado MA2 não eram vigorosas de coloração verde-clara, algumas estioladas e com pouca formação de folhas expandidas. Não houve formação de raízes adventícias (Figura 8C).

A inoculação do MF6 proporcionou plântulas quase totalmente despigmentadas (branco), pequenas, com pouca formação de folhas expandidas, sendo que algumas eram senescentes. Não houve formação de raízes adventícias (Figura 8D).

A inoculação dos isolados MC2, MA1, MC1 e MA3 não foi benéfica, já que os mesmos demonstraram taxa de crescimento elevada, tomaram todo o ambiente do frasco e levaram as plântulas à morte. Por outro lado, a inoculação em frascos do isolado MF6 proporcionou maior número médio de gemas e folhas expandidas das plântulas de mangaba. O método de inoculação utilizando discos com culturas (fungos) e alíquotas de 15 µL (bactérias), proporcionou plântulas mais vigorosas, de coloração verde-escura característica da espécie, formação de folhas expandidas e raízes adventícias.

A inoculação do isolado MF4 proporcionou maior comprimento médio de parte aérea e número médio de gemas. Contrariamente, o método utilizando o sobrenadante dos isolados proporcionou plântulas pouco vigorosas, de coloração verde-clara ou quase totalmente despigmentadas (brancas), com pouca formação de folhas expandidas e algumas senescentes. Desta forma, para o cultivo *in vitro* de plântulas de mangaba, o recomendado seria a inoculação do isolado MF6, utilizando o método 1, em frascos.

#### 4. CONCLUSÕES

O isolado MF6 proporcionou maior número médio de gemas e folhas expandidas, com as plântulas de mangaba cultivadas em frascos.

Maior comprimento médio de parte aérea e número médio de gemas foi obtido com a inoculação do isolado MF4, em tubos de ensaio.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F. F. de. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência Agrotécnica**, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008.

BARROS, D. I.; BRUNO, R de L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação. **Revista Acta Tecnológica**, v. 5, n.01, p. 31-43, 2010.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF-kB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1064-1069, 2009.

FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 1, p. 89-111, 2004.

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

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. de L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G. de; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v. 32, n. 2, p. 2-8, 2005.

SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S.; **Microbiota do solo e Qualidade ambiental**. Instituto Agrônomo, Campinas-SP, 312 p., 2007.

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

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p.15-22. 1982.

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, 320 p.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v. 7, p. 53-65, 1943.

## CONCLUSÃO GERAL

O volume de 20 mL L<sup>-1</sup> de meio de cultivo foi o mais adequado por propiciar menor quantidade de senescência, enquanto o meio WPM (50%) promove maior crescimento *in vitro* de plântulas de mangabeira.

O ajuste de pH de 5,0 proporcionou maior crescimento *in vitro* de plântulas de mangaba. Já o tampão de algodão favoreceu maior comprimento médio de parte aérea e porcentagem de raízes adventícias.

Sementes de mangabeira inoculadas em meio líquido, com ou sem 15g L<sup>-1</sup> de sacarose tiveram os maiores índices de porcentagem de germinação e vigor. Já o meio líquido, sem agitação, propicia maior crescimento de plântulas de mangabeira, constatado por meio do comprimento e número médio de gemas.

Para o cultivo *in vitro* das plântulas de mangabeira, a utilização de 4,65 µM KIN em meio proporciona maior crescimento.

Meio de cultivo com sacarose e sem carvão ativado, suplementado com 36,9 µM de IBA proporciona maior crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de mangabeira.

A utilização de meio de cultura, contendo FePO<sub>4</sub>, é o mais indicado para isolamento de microrganismos solubilizadores de fosfato de solo de mangabeira.

Entre os 15 isolados obtidos, apenas sete demonstraram capacidade para solubilizar as três fontes de fosfato utilizadas. Os maiores índices de solubilização para AlPO<sub>4</sub>, CaHPO<sub>4</sub> e FePO<sub>4</sub> foram obtidos pelos isolados MF5, MA3 e MA6 respectivamente.

Maiores taxas de solubilização em meio líquido para AlPO<sub>4</sub> e FePO<sub>4</sub> foram obtidas pelos isolados MC1 e MC2, respectivamente. Enquanto para cálcio os isolados MC1, MC2, MA5 e MF4 obtiveram as maiores médias. Entre as fontes de fosfato todos os isolados obtiveram os maiores valores quando o meio de cultura estava suplementado com FePO<sub>4</sub>.

A maior produção de AIA foi atingida pelo isolado MF6.

Para o cultivo *in vitro* de plântulas de mangaba, é recomendada a inoculação do isolado MF6, em frascos, já que proporciona maior crescimento das plântulas.