

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO *CAMPUS* RIO VERDE

CULTIVO *IN VITRO* DE MURICI
(*Byrsonima cydoniifolia* A. JUSS.)
A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.

Autora: Cíntia de Oliveira Martendal
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

RIO VERDE – GO
fevereiro – 2012

CULTIVO *IN VITRO* DE MURICI
(*Byrsonima cydoniifolia* A. JUSS.)
A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.

Autora: Cíntia de Oliveira Martendal
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

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

Rio Verde – GO
fevereiro – 2012

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

CULTIVO *IN VITRO* DE MURICI (*Byrsonima cydoniifolia*
A. JUSS.) A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.

Autora: Cíntia de Oliveira Martendal
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

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

APROVADA em 23 de fevereiro de 2012.

Prof^a. Dra. Flávia Dionísio Pereira
Avaliadora externa
Bolsista PNPD – COMIGO

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
Avaliador externo
UFU

Prof. Dr. João das Graças Santana
Avaliador interno
IFGoiano/RV

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
Presidente da banca
IFGoiano/RV

M33c

MARTENDAL, Cíntia de Oliveira.

Cultivo *in vitro* de Murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) a partir de embriões zigóticos / Cíntia de Oliveira Martendal – Rio Verde – 2012.

71 f.: il.;

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde - 2012.

1. Murici 2. Cultivo *in vitro* 3. Embriões zigóticos
Gilmar José Terra. CRB1 2524

CDU 582.754

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter sempre iluminado meu caminho e por permitir a realização de mais uma conquista em minha vida.

Aos meus pais Pedro Martendal e Ladir Francisca de Oliveira, pelo apoio, dedicação e por terem orientado minha formação. A minha irmã Letícia de Oliveira Martendal, pelo carinho e amizade que nos une.

Ao André Gustavo L. de Baptista, pela ajuda, apoio, compreensão, carinho e principalmente pela paciência nos momentos que estive ausente conduzindo esse trabalho.

Ao Dr. Fabiano Guimarães Silva, pela orientação e ensinamentos que me auxiliaram para a execução deste e de outros trabalhos.

À Dra. Flávia Dionísio Pereira, pela grande ajuda durante todas as etapas deste trabalho (nos momentos de dificuldades e de vitórias), pela amizade conquistada e pelos conselhos que foram de grande importância para minha formação pessoal e profissional e principalmente por ter acreditado no meu potencial.

À Dra. Alessandra Cristina B. de A. M. Hara, por todo carinho, amizade, paciência e auxílio durante a fase que estivemos juntas.

Aos colegas e amigos do Mestrado e do Laboratório de Cultura de Tecido, pela amizade e auxílio nos trabalhos e pelos momentos de descontração e alegria.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, do Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À EMATER e em especial ao Sr. Laureano Magno Vargas, pela atenção, disponibilidade e pela doação do material vegetal utilizado neste trabalho.

À CAPES e FAPEG pelo apoio financeiro.

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

Muito obrigada !

BIOGRAFIA DO AUTOR

Cíntia de Oliveira Martendal, filha de Pedro Martendal e Ladir Francisca de Oliveira, nasceu em 23 de junho de 1980, na cidade de Porto Alegre, RS. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Rio Verde (2001), especialização em Biologia aplicada à Biotecnologia e Saúde pela Universidade de Rio Verde (2004). Iniciou no mestrado em Ciências Agrárias em março de 2010 no Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde, tendo defendido sua dissertação em fevereiro de 2012.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bioma Cerrado.....	1
1.2. Frutíferas do Cerrado.....	2
1.3. Murici (<i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss.).....	3
1.4. Cultura de Tecidos Vegetais.....	4
1.5. Composição do meio de cultivo.....	6
1.6. Referências.....	7
2. OBJETIVOS GERAIS.....	11
3. CAPÍTULO II - Cultivo <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de murici (<i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss.): estabelecimento, desinfestação e germinação.....	12
3.1. RESUMO.....	12
3.2. ABSTRACT.....	12
3.3. INTRODUÇÃO.....	13
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.4.1. Ensaios I: Influência do tempo de imersão dos embriões zigóticos de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss. em solução de hipoclorito de sódio.....	15
3.4.2. Ensaio II: Germinação dos embriões zigóticos de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss. em diferentes meios de cultivo, acrescidos ou não de sacarose.....	17
3.4.3. Ensaio III: Cultivo de plântulas de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss. em diferentes meios de cultivo.....	18
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
3.5.1. Ensaios I: Influência do tempo de imersão dos embriões zigóticos de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss. em solução de hipoclorito de sódio.....	19
3.5.2. Ensaio II: Germinação dos embriões zigóticos de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss. em diferentes meios de cultivo, acrescidos ou não de sacarose.....	21

3.5.3. Ensaio III: Cultivo de plântulas de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss. em diferentes meios de cultivo.....	23
3.6. CONCLUSÕES.....	26
3.7. AGRADECIMENTO.....	27
3.8. REFERÊNCIAS.....	27
4. CAPÍTULO III – Sacarose e volume do meio de cultivo no crescimento <i>in vitro</i> de murici (<i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss.).....	30
4.1. RESUMO.....	30
4.2. ABSTRACT.....	30
4.3. INTRODUÇÃO.....	31
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.4.1. Ensaio I: Utilização de diferentes concentrações de sacarose no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss.....	32
4.4.2. Ensaio II: Uso de diferentes volumes do meio de cultivo no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss.....	33
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.5.1. Ensaio I: Utilização de diferentes concentrações de sacarose no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss.....	34
4.5.2. Ensaio II: Uso de diferentes volumes do meio de cultivo no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss.....	37
4.6. CONCLUSÕES.....	39
4.7. AGRADECIMENTO.....	39
4.8. REFERÊNCIAS.....	39
5. CAPÍTULO IV - O pH e a concentração de nutrientes minerais no crescimento <i>in vitro</i> de murici (<i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss).....	43
5.1. RESUMO.....	43
5.2. ABSTRACT.....	43
5.3. INTRODUÇÃO.....	44
5.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.4.1. Ensaio I: O pH no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss.....	46
5.4.2. Ensaio II: Concentração de fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) e sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O) no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss.....	46
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.5.1. Ensaio I: O pH no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss.....	47
5.5.2. Ensaio II: Concentração de fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) e sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O) no crescimento <i>in vitro</i> de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss.....	49
5.6. CONCLUSÕES.....	52
5.7. AGRADECIMENTO.....	52
5.8. REFERÊNCIAS.....	52

6. CAPÍTULO V - Reguladores de crescimento e tipos de vedações no cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodais de murici (<i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss.).....	55
6.1. RESUMO.....	55
6.2. ABSTRACT.....	55
6.3. INTRODUÇÃO.....	56
6.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
6.4.1. Ensaio I e II: Concentrações de BAP e NAA na multiplicação de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss., a partir de segmentos nodais.....	58
6.4.2. Ensaio III: Estímulo do comportamento fotoautotrófico: crescimento da parte aérea e raiz.....	58
6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.5.1. Ensaio I: Concentrações de BAP na multiplicação de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss., a partir de segmentos nodais.....	59
6.5.2. Ensaio II: Concentrações de ANA na multiplicação de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss., a partir de segmentos nodais.....	62
6.5.3. Ensaio III: Estímulo do comportamento fotoautotrófico: crescimento da parte aérea e raiz.....	64
6.6. CONCLUSÕES.....	67
6.7. AGRADECIMENTO.....	67
6.8. REFERÊNCIAS.....	67
7. CONCLUSÃO GERAL.....	71

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Contaminação, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e média do comprimento da parte aérea de <i>B. cydoniifolia</i> A. Juss. em função da concentração de sais do meio MS e WPM na ausência de sacarose e o tratamento controle água-ágar, aos 30 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.....	22
Tabela 2. Comprimento da parte aérea (cm), da raiz (cm) e o número de folhas por plântulas de <i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss. em relação a concentração de sais do meio MS e WPM, aos 30 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.....	24
Tabela 3. Comprimento da parte aérea (cm) e número de folhas por plântula de <i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss. em relação a concentração de sais do meio MS e WPM, aos 60 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.....	25
CAPÍTULO IV	
Tabela 1. Porcentagem da formação de calo, número de folhas por plântula e comprimento médio da parte aérea (cm), número de raiz por plântula, comprimento médio de raízes (cm) de <i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss. em relação ao tipo de vedação na presença e ausência de sacarose, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Rio Verde-GO, 2011.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I

- Figura 1. *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.: (A) arbusto; (B) fruto; (C) diásporos; (D) diásporo quebrado composto por dois embriões com tegumento; (E) embrião com formato em espiral. Partes do diásporo: (EN) endocarpo; (EB) embrião com tegumento. Rio Verde-GO, 2012. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 4

CAPÍTULO II

- Figura 1. Material Vegetal de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.: (A) arbusto; (B) folhas e flores; (C) fruto. Rio Verde-GO, 2012. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 15
- Figura 2. Material vegetal de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.: (A) diásporos; (B) quebra do diásporo em morsa de mesa; (C) diásporo quebrado composto por dois embriões com tegumento. Partes do diásporo: (EN) endocarpo; (EB) embrião com tegumento. Rio Verde-GO, 2012. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 16
- Figura 3. Germinação e crescimento *in vitro* de embrião zigótico de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.: (A) embrião no 1º dia de cultivo; (B) embrião com protusão radicular aos 7 dias de cultivo; (C) formação de plântula aos 14 dias de cultivo; (D) plântula aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 19
- Figura 4. Assepsia de embriões zigóticos de *B. cydoniifolia* A. Juss. aos 30 dias de cultivo *in vitro*: (A) porcentagem de contaminação em função dos diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%); (B) comprimento médio da parte aérea em função da concentração de hipoclorito de sódio (2,5%); (C)

- comprimento médio de raízes em função da concentração de hipoclorito de sódio (2,5%). Rio Verde-GO, 2012..... 21
- Figura 5. *B. cydoniifolia* A. Juss.: (A) Plântula aos 30 dias de cultivo *in vitro*; (B-C) plântula com excisão nas folhas dicotiledonares e na radícula; (D) plântula excisada no meio de cultivo; (E) plântula aos 30 dias de cultivo; (F) plântula aos 60 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 24

CAPÍTULO III

- Figura 1. Plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss., aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose: (A) meio de cultivo na ausência de sacarose; (B) detalhe da formação do sistema radicular no meio de cultivo com 30 g L⁻¹ de sacarose; (C) formação da parte aérea no meio de cultivo com 30 g L⁻¹ de sacarose. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 35
- Figura 2. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes concentrações de sacarose, avaliadas aos 30 dias: (A) comprimento médio da parte aérea (cm); (B) número médio de folhas por explante; (C) número médio de gemas por explante; (D) comprimento médio de raízes (cm). Rio Verde-GO, 2012..... 36
- Figura 3. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes volumes de meio de cultivo (mL), avaliadas aos 60 dias: (A) comprimento médio da parte aérea (cm); (B) comprimento médio de raízes (cm). Rio Verde-GO, 2012..... 38
- Figura 4. Plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss., aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes volumes de meio de cultivo: (A) 10 mL; (B) 15 mL; (C) 20 mL; (D) 25 mL e (E) 30 mL. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm..... 39

CAPÍTULO IV

- Figura 1. Plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss., aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes valores de pH do meio: (A) meio de cultivo com pH 5,0; (B) meio de cultivo com pH 6,5. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 47
- Figura 2. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes valores de pHs, avaliadas aos 30 dias: (A) comprimento médio da parte aérea (cm); (B) número médio de folhas por explante; (C) número médio de raízes por explante; (D) comprimento médio de raízes (cm). Rio Verde-GO, 2011..... 48
- Figura 3. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes concentrações de KH₂PO₄ (mg L⁻¹) avaliadas aos 60 dias: (A) comprimento médio de parte aérea (cm); e em diferentes

concentrações de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg L^{-1}) avaliadas aos 60 dias (B) número médio de folhas expandidas por explante; (C) número médio de gemas por explante; (D) número médio de raízes por explante..... 51

CAPÍTULO V

- Figura 1. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes concentrações de BAP (μM), avaliadas aos 60 dias: (A) porcentagem de formação de calo; (B) número de folhas expandidas por explante; (C) porcentagem de enraizamento em relação à concentração de ANA (μM). Rio Verde-GO, 2012..... 60
- Figura 2. Crescimento *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., provenientes de segmentos nodais: (A) plântula no meio de cultivo sem regulador de crescimento; (B) plântula com várias brotações no meio de cultivo acrescido com $11,1 \mu\text{M}$ de BAP; (C) plântula com as extremidades das folhas avermelhadas, sem a formação de raiz, em meio de cultivo contendo $22,2 \mu\text{M}$ de BAP; (D) plântula com coloração avermelhada sem a formação de raiz, em meio de cultivo acrescido com $44,4 \mu\text{M}$ de BAP; (E) plântula com formação de calos, em meio de cultivo acrescido com $44,4 \mu\text{M}$ de BAP; CA: calo. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 61
- Figura 3. Crescimento *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., provenientes de segmentos nodais: (A) plântula, acrescido com $13,43 \mu\text{M}$ de ANA; (B) plântula, acrescido com $26,85 \mu\text{M}$ de NAA; CA: calo. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal..... 62
- Figura 4. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes concentrações de ANA (μM), avaliadas aos 60 dias: (A) porcentagem de formação de calo; (B) número médio de brotos por explantes; (C) número de folhas expandidas por explante; (D) comprimento médio da parte aérea (cm); (E) porcentagem de enraizamento. Rio Verde-GO, 2012..... 63
- Figura 5. Plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss. provenientes de segmentos nodais, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tipos de vedações com presença ou ausência da sacarose: (A) vedação com tampa plástica sem sacarose ; (B) vedação com vedafilme sem sacarose; (C) vedação com tampão de algodão sem sacarose; (D) vedação com tampa plástica com sacarose ; (E) vedação com vedafilme com sacarose; (F) vedação com tampão de algodão com sacarose..... 66

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

AIB	Ácido 3-Indol Butírico
ANA	Ácido Naftaleno Acético
BAP	Benzilaminopurina
MS	Meio nutritivo elaborado por Murashige e Skoog
μM	Micromolar
μmol	Micromol
NaOCL	Hipoclorito de sódio
pH	Potencial de hidrogênio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio
WPM	Wood Plant Medium, meio nutritivo elaborado por Lloyd e McCown

RESUMO

O murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) é uma árvore de pequeno porte do bioma do cerrado que tem potencial na medicina popular, na produção de alimentos e de lenha. Sua exploração é extrativista, sendo que as plantações comerciais são praticamente inexistentes. Porém, essa espécie tem dificuldades na reprodução, causada principalmente, pela presença de um endocarpo esclerificado que envolve o embrião e atua como uma barreira mecânica, prejudicando a protrusão da radícula e, conseqüentemente, a emergência da plântula. Assim, as técnicas de cultura de tecidos constituem uma importante ferramenta que auxiliam na reprodução dessa espécie, em que mudas podem ser produzidas o ano todo, de maneira uniforme, em um curto espaço de tempo e livres de contaminantes. Com este estudo, objetivou-se o cultivo *in vitro* de plantas de murici, para posteriormente implantar um sistema de produção de mudas, que permitirá disponibilizar, em menor tempo, mudas com alto padrão genético e fitossanitário, oferecendo uma alternativa na geração de renda para o produtor e para a preservação da natureza. Para isso, foram realizados nove ensaios, visando o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* da espécie em questão. Testou-se a assepsia dos embriões zigóticos, no hipoclorito de sódio (2,5%) com e sem a imersão em álcool 70%; a germinação de embriões zigóticos e o crescimento de plântulas nos meios de cultivo MS e WPM em diferentes concentrações de sais. Utilizou-se plântulas, para testar o efeito das diferentes concentrações de sacarose, volumes do meio de cultivo; valores de pHs, concentrações de nutrientes minerais no meio de cultivo, sendo utilizados o KH_2PO_4 e o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Por fim, testou-se reguladores de crescimento (BAP e ANA) e tipos de vedações utilizando segmentos nodais. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que para a espécie de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.) a melhor assepsia dos embriões zigóticos foi utilizando álcool 70% durante 1 minuto e

hipoclorito de sódio, durante 25 minutos. Para a germinação dos embriões, o meio de cultivo mais adequado foi preparado com água e ágar, sendo cultivados por 30 dias e para o crescimento das plântulas, o meio de cultivo WPM 50% foi o mais adequado. A adição de 30 g L^{-1} de sacarose no meio de cultivo, o volume de meio com 30 mL e o pH 5,0 proporcionaram as melhores resposta para o cultivo *in vitro* dessa espécie. Os tipos de vedações não influenciaram no crescimento. A concentração de $170 \text{ mg L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ e de 37 mg L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e para os reguladores de crescimento, a concentração de $11,1 \text{ }\mu\text{M}$ de BAP e de $13,43 \text{ }\mu\text{M}$ de ANA, isoladamente, foram os mais adequados para o cultivo.

PALAVRAS-CHAVE: *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, cerrado, embrião zigótico, sacarose, pH, nutrientes minerais, regulador de crescimento.

ABSTRACT

The murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) is a small tree from cerrado that has potential in the popular medicine, in food production and firewood. Its exploration is extractive, and the commercial plantations are practically nonexistent. However, this species has reproductive difficulties, caused mainly by the presence of a sclerenchymatous endocarp that surrounds the embryo and acts as a mechanical barrier, damaging the radicle protrusion and, consequently, the seedling emergence. Therefore, the techniques of tissue culture are an important tool that assists in the reproduction of this species, where plants can be produced during all year, uniformly in a short time and free of contaminants. This study aimed to in vitro culture of murici plants to later implement a system of seedling production, which will provide, in less time, with high seedling and plant genetic pattern, providing an alternative income generation for the producer and nature preservation. For this, nine tests were performed, aiming at the establishment and in vitro multiplication of the species in question. There were tested whether the asepsis of the zygotic embryos in sodium hypochlorite (2.5%) with and without immersion in 70% alcohol, the germination of zygotic embryos and seedling growth in culture media and WPM MS salts in different concentrations. Seedlings were used to test the effect of different sucrose concentrations, volumes of culture medium; pHs, concentrations of nutrients in the culture medium, which were used KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Finally, there were tested growth regulators (BAP and NAA) and types of seals using nodal segments. According to results obtained, it was found that murici (*B. A. cydoniifolia* Juss.) the best zygotic embryo aseptically were using sodium hypochlorite for 25 minutes. For embryos germination, the most appropriate culture medium was prepared with water and agar, and cultured for 30 days and for seedling

growth, the culture medium WPM 50% was more appropriate. The addition of 30 g L⁻¹ sucrose in the culture medium, the volume of medium with 30 ml and pH 5.0 gave the best response to the in vitro culture of species. The types of seals did not affect growth. The concentration of 170 mg L⁻¹ KH₂PO₄ and 37 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O and growth regulators, 11.1 mM the concentration of BAP and 13.43 mM NAA, were most suitable for cultivation.

KEY WORDS: *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss., cerrado, zygotic embryo, sucrose, pH, mineral nutrients, plant growth regulator.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bioma Cerrado

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando 21% do território nacional e 85% do Planalto Central do Brasil, sendo superado em área apenas pela Floresta Amazônica (Klink & Machado, 2005). Este bioma abrange em maior quantidade o Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Tocantins e tem 204 milhões de hectares, formado de grande biodiversidade de fauna e flora (Avidos & Ferreira, 2003). Abriga cerca de 10 mil espécies de plantas dos quais 4400 seriam endêmicas, correspondendo a 1,5% da flora mundial (Myers et al., 2000), de forma que essa riqueza de espécies representa cerca de 30% da biodiversidade brasileira (Aguiar & Camargo, 2004). Segundo Proença et al. (2000), o cerrado é o mais brasileiro dos biomas sul-americanos, está localizado quase que completamente dentro do território nacional, com exceção de pequenas áreas do cerrado na Bolívia e no Paraguai.

Esse bioma possui inúmeras espécies de interesse econômico como plantas medicinais e frutíferas que geralmente são utilizadas pela população local, como fonte de alimento e no tratamento de muitas doenças (Alves et al., 2000). Todavia, o desconhecimento do potencial de uso dos recursos naturais, o desrespeito às leis de proteção ambiental, as queimadas e a intensa exploração agrícola, têm provocado prejuízos irreparáveis ao solo, à fauna, à flora e aos recursos hídricos, comprometendo a sustentabilidade desse ecossistema e de muitas espécies vegetais, incluindo as fruteiras

nativas (Silva et al., 2001). Assim, buscam-se medidas e alternativas para a preservação do cerrado brasileiro, que é considerado uma fonte natural de recursos biológicos, com inúmeras espécies vegetais de elevado valor nutricional e medicinal (Rodrigues & Carvalho, 2001).

1.2 Frutíferas do Cerrado

As espécies frutíferas nativas ocupam um lugar importante no ecossistema do cerrado, que geralmente são retiradas de forma extrativista e consumidas pela população local. Esses frutos possuem sabores exóticos, característicos e elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais e podem ser consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes, doces, geleias (Avidos & Ferreira, 2003; Pinhal et al., 2011).

No entanto, essas espécies tem dificuldades na propagação, fatores como heterogeneidade no processo de maturação dos frutos e dormência nas sementes, prejudicam a germinação e a formação de mudas em escala comercial (Pinhal et al., 2011).

É muito importante investir no trabalho de domesticação dessas fruteiras, para que possam ser cultivadas em pomares comerciais. Dessa forma, evita-se o extrativismo e ao mesmo tempo preserva as espécies em seu habitat natural (Avidos & Ferreira, 2003).

A fruticultura brasileira é reconhecida mundialmente como uma das mais diversificadas. As cadeias produtivas nacionais se dedicaram nos últimos anos a arrojados investimentos no aperfeiçoamento de seus pomares e estruturas industriais, buscando principalmente qualidade (Reetz, 2007). Instituições governamentais vêm investindo em pesquisas com a finalidade de melhorar os sistemas de produção em uso. A introdução de novas espécies com melhoramento genético contribui para o aumento da eficiência do sistema produtivo. A muda de qualidade potencializa a resposta à tecnologia aplicada no pomar, auxiliando na redução de custos e na produção de frutas com alta qualidade e produtividade (Oliveira et al., 2004). O objetivo principal da fruticultura é dispor de frutas com aparência uniforme, polpa de textura sucosa, doce, bom sabor e aroma (Nakasu, 2003). Para que esse objetivo seja alcançado é necessário primeiramente infraestrutura apropriada, mudas sadias e conhecimento tecnológico da cultura, tornando a produção eficiente e economicamente viável (Hoffmann et al.,

2005). Na produção comercial de mudas frutíferas, utiliza-se mais comumente a propagação assexuada, ou seja, por estruturas vegetativas, desejando manter as características agrônômicas da planta matriz. Há uma grande variabilidade entre as espécies produzidas sexuadamente, e na propagação vegetativa se tem espécies morfológicamente uniformes (Assis & Teixeira, 1998).

1.3 Murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.)

O gênero *Byrsonima* Rich. ex Kunth, cujas espécies são popularmente conhecidas como “murici”, tem aproximadamente 150 espécies nas regiões neotropicais (Joly, 2002; Vicentin et al., 1999). O murici pertence a família Malpighiaceae, sendo também popularmente conhecida por murici-rasteiro, orelha-de-veado, douradinha-falsa, murico grande, murici pequeno. É um arbusto que pode medir até 5m de comprimento, tem o tronco nodoso, tortuoso, casca suberosa, escura e longitudinalmente fissurada (Lorenzi, 1998).

A espécie *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss é uma árvore de pequeno porte do bioma cerrado, e chega a medir aproximadamente 1,5 m aos 2 anos de idade (Figura 1 A) (Lorenzi, 1998). Tem potencial na medicina popular, na produção de alimentos e da madeira, sua utilização é basicamente extrativista, feito pela população local e basicamente não existem relatos de pomares comerciais. O murici tem o fruto do tipo drupa, depresso-globoso, mesocarpo carnoso, fino, endocarpo rígido, contendo de 1 a 3 sementes e o embrião é do tipo circinado, cilíndrico e com formato em espiral (Figura 1 B-E). Em uma planta, encontra-se, aproximadamente, de 100 a 500 frutos, pesando de 1 a 4 g cada. Esses frutos possuem alto valor nutricional, tem sabor forte, agridoce e ligeiramente oleoso, podendo ser consumido *in natura*, além de ser usado na fabricação de doces, sucos, sorvetes e licores (Silva, 2001; Figueiredo et al., 2005; Almeida et al., 2008; Guimarães & Silva, 2008).

Entretanto, o murici não tem no fruto sua única utilidade, mesmo que não haja registro de produção em escala comercial, a madeira é própria para a construção civil. Na medicina popular, a casca serve como antitérmico e além disso, ela é adstringente (contém de 15 a 20% de tanino), podendo ser utilizada na indústria de curtume. Dela se extrai ainda, um corante preto utilizado na indústria de tecidos, conferindo cor cinzenta ao algodão. As folhas geralmente são consumidas por bovinos, por isso a espécie também tem grande potencial forrageiro (Almeida et al., 1998).

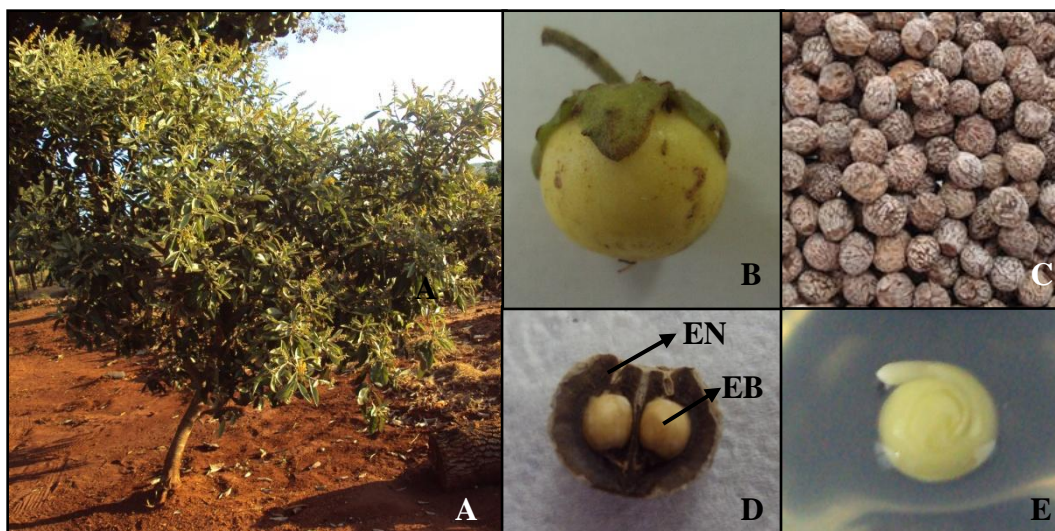


Figura 1. *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.: (A) arbusto; (B) fruto; (C) diásporos; (D) diásporo quebrado composto por dois embriões com tegumento; (E) embrião com formato em espiral. Partes do diásporo: (EN) endocarpo; (EB) embrião com tegumento. Rio Verde-GO, 2012. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

O murici floresce e frutifica praticamente durante o ano todo, mas a grande dificuldade de sua propagação sexuada é decorrente da baixa taxa de germinação e emergência lenta das plântulas em campo (Lorenzi, 2002). A maior dificuldade de reprodução é causada, principalmente, pela presença de um endocarpo esclerificado e rígido que envolve o embrião e que atua como uma barreira mecânica, dificultando a protrusão radicular e, conseqüentemente, a emergência da plântula (Almeida et al., 1998). Assim, o conhecimento sobre cultivo *in vitro* de plantas nativas do cerrado ainda é pouco explorado, estas plantas se encontram em estado silvestre, oferecendo grande variabilidade genética (Pinhal et al., 2011).

1.4 Cultura de Tecidos Vegetais

Técnicas de cultura de tecidos vegetais, como a micropropagação representa uma alternativa para serem utilizadas em espécies de fruteiras do cerrado, algumas já com sucesso enquanto outras, ainda necessitam de mais estudos (Pinhal et al., 2011). Para o emprego da micropropagação com essas espécies, um fator fundamental é o conhecimento da tecnologia e mão de obra especializada para a propagação em laboratório, o qual é o resultado de estudos realizados com os fatores que afetam o crescimento das plantas *in vitro* (Schuch & Erig, 2005; Souza et al., 2008).

A cultura de tecidos é feita a partir do isolamento de um tecido ou órgão vegetal, chamado de explante que é todo segmentado de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*. Pode ser usado um segmento de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido que responda as condições de indução em meio de cultivo, com vista à regeneração vegetal (Torres et al., 2000).

Uma das técnicas da cultura de tecidos é a micropropagação, que consiste na regeneração e multiplicação de mudas a partir de uma célula ou de segmentos saudáveis de tecidos de uma planta (Erig & Schuch, 2005a). Essa técnica engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até o seu enraizamento, culminando com a aclimatização da plântula (Bastos et al., 2007). O método também permite a produção massal de mudas, independente da época do ano e com ótimas condições sanitárias (Erig et al., 2004). Para espécies frutíferas, a micropropagação tem sido utilizada com sucesso técnico e econômico, pela sua rapidez e eficiência de produção. O pleno potencial de produção depende da interação dos fatores da planta e dos fatores ambientais (Erig & Schuch, 2005b).

Para o estabelecimento de uma cultura *in vitro* é necessária uma planta-matriz sadia para a obtenção de explantes. Os explantes podem ser gemas axilares ou apicais, meristemas e tecidos diferenciados já mencionados (Fachinello & Bianchi, 2005) e embriões zigóticos. Segundo Santos et al., (2005), as brotações oriundas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos, além de servirem como explantes, também formam raízes adventícias, o que permite o posterior transplante das plântulas para condições *ex vitro*.

Além da escolha do explante, o uso de reguladores de crescimento, tais como auxinas e citocininas, isolados ou em combinação, tem sido empregado, visando a um rápido crescimento de células, acompanhado do desenvolvimento organizado de raízes e da parte aérea (Diniz et al., 2006).

Portanto, as técnicas de cultivo *in vitro* representam uma importante alternativa para a produção de mudas e conservação dessa espécie, com destaque para a micropropagação, que permite obter mudas com características genéticas idênticas às da planta-matriz, a partir de genótipos selecionados. As mudas produzidas são livres de vírus, uniformes e obtidas em um curto espaço de tempo (Villa et al., 2008). Além disso, a clonagem *in vitro* é particularmente útil para a preservação de espécies ameaçadas de extinção, propagação de espécies que possuem sementes recalcitrantes ou de ciclo de vida longo (Rodrigues et al., 2009). Relatos sobre a utilização dessas

técnicas em fruteiras do cerrado ainda são escassos e restritos a poucas espécies. Dessa maneira, é necessário ampliar e aperfeiçoar essas técnicas nas fruteiras do cerrado, mesmo aquelas já estudadas, dando maior atenção para aquelas que apresentem dificuldades de multiplicação por outros métodos ou que têm limitada variabilidade genética natural (Pinhal et al., 2011).

1.5 Fatores que afetam o cultivo *in vitro*

O meio de cultivo é constituído de todos os nutrientes necessários para o crescimento da planta, além de uma fonte de carbono. Pode-se utilizar ainda, vitaminas e reguladores de crescimento (Andrade, 2002). Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese, por meio de propriedades osmóticas (George et al., 2008).

Diversas formulações de meio têm sido utilizadas no cultivo de explantes. Dentre elas, a formulação de Murashige & Skoog, (1962) é a mais utilizada, principalmente nos trabalhos de multiplicação para a maioria das espécies, porém para espécies lenhosas, o meio WPM (Lloyd & MacCown, 1980), é o mais indicado.

O carboidrato mais utilizado no meio de cultivo é a sacarose, que atua como fonte de energia e proporciona as mais altas taxas de crescimento, na maioria das espécies (Jesus et al., 2011), além disso, afeta a produção de metabólitos secundários de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (Pasqual, 2001).

Outros fatores também são de extrema importância para o cultivo *in vitro*, como os nutrientes minerais e o valor do pH do meio de cultivo. Os nutrientes são absorvidos de acordo com as exigências nutricionais de cada espécie vegetal. Entretanto, a acidez ou a basicidade, quando bem ajustados, podem promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante (Pasqual et al., 2002).

Os tipos de recipiente, vedações e o volume de meio, ainda são poucos estudados, mas pode influenciar direta e indiretamente o cultivo *in vitro*. Estes fatores são responsáveis pelo ambiente heterogêneo que se forma dentro do frasco e pela variabilidade no comportamento das culturas (Bandeira et al., 2007).

Em relação aos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura as auxinas são utilizadas com o objetivo de estimular o crescimento da parte aérea por

meio da expansão e do alongamento celular e induzir raízes adventícias. As citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, aumentando a taxa de multiplicação, embora nem sempre seja necessária a utilização de reguladores (Grimaldi et al., 2008; Kielse et al., 2009).

1.6 Referências

AGUIAR, L.M.S.; CAMARGO, A.J.A. **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 249p.

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

ALMEIDA, S. P.; COSTA, T. S. A; SILVA, J. A. Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds), **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF, Embrapa Informação Tecnológica. 2008, p.351-381.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367-373, 2000.

ANDRADE, S. R. M.; **Princípios da cultura de Tecidos Vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, 2002, p.7-9.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C. ; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI – Embrapa – CNPH, Parte II, 1998, p.261-296.

AVIDOS, M.F.D.; FERREIRA, L.T. **Frutos dos cerrados: preservação gera muitos frutos**. 2003. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br/bio15/frutos.pdf>> Acesso em: 09 outubro, 2011.

BANDEIRA, J. M.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A. R.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 472-474, 2007.

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

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, Parte II, 1998, p.81-130.

DE RIEK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, n.3, p.269-278, 1997.

DINIZ, J. D. N.; MAGALHÃES, J. R.; INNECCO, R.; ALMEIDA, J. L.; PINHO, J. L. N. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de guaco. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.37, n.1, p.59-64, 2006.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W.; BRAGA, E.J.B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p. 275-277, 2004 .

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, Curitiba, v.6, n.1, p. 91-96, 2005a.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005b.

FACHINELLO, C.A.; BIANCHI, V.J. Produção de mudas certificadas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. p.207-220.

FIGUEIREDO, M.E.; MICHELIN, D.C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M.A.; SANTOS, L.C.; ALMEIDA, L.F.R.; BRITO, A.R.M.S.; SALGADO, H.R.N. & VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** , São Paulo, v.41, n.1, p.79-83, 2005.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK ,G.J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrech: Background, 3ed., 2008, 501p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v.1, 1998, p.183-260.

GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M. A.; MUNIZ, A. W.; GUIDOLIN, A. F. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.7, n.2, p.160-168, 2008.

GUIMARÃES, M. M. e SILVA M. S. Valor nutricional e características químicas e físicas dos frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p.817-821, 2008.

HOFFMANN, A. ; NACHTIGAL, J.C. ; FACHINELLO, J.C. Infra-estrutura para propagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI – Embrapa – CNPH, Cap.1, 2005, p.13-44.

JESUS, A. M. S.; VILLA, F.; LARA, C. C.; PASQUAL, M. Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n.6, p. 679-684, 2011.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional, São Paulo, 13 ed, 2002.

KIELSE, P.; FRANCO, E. T. H.; PARANHOS, J. T.; LIMA, A. P. S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1098-1104, 2009.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p.147-155, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa: Plantarum, v. 2, 352 p., 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. São Paulo: Nova Odessa, v. 1, 386 p., 2002.

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

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

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v.403, p.853-858, 2000.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. *In*: CENTELLAS-QUEZADA, A.; NAKASU, B. H.; HERTER, F. G. **Pêra**: Produção. (Pelotas: Embrapa Clima Temperado); Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 105p.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A.F.P.; NICKEL, O. **Limpeza de patógenos e propagação *in vitro* de cultivares de pereira**. Pelotas: EMBRAPA, 2004.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**: tecnologia e aplicações: meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F., CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira ‘Poncã’ em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, 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**, Santa Maria, v.41, n.7, p. 1136-1142, 2011.

PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A. P. **Flores e frutos do cerrado**. Editora UnB, Brasília, 2000, 226p.

REETZ, E.R. **Anuário brasileiro de fruticultura / ERNA**. Ed. Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, RS, Ed. 2007, 136p.

RODRIGUES, M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; MARTINOTTO, C.; SILVA JR, J. M. Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.1, p.21-26, 2009.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. **Plantas medicinais no domínio dos Cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

SANTOS, C. G. dos; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; SANTANA, J. R. F de; PEREIRA, A. B. Propagação de *coffea arabica* c.v. acaia Cerrado por meio do cultivo *in vitro* de embriões. **Plant cell culture & micropropagation**., Lavras, MG, v. 1, n. 1, p. 19-23, 2005.

SCHUCH, M.W; ERIG. A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGA, J. C. (Eds.). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.155-173.

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

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M. W.; DONINI, L. P; RIBEIRO, M. F. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2046-2048, 2008.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F.G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

VICENTINI, A., ANDERSON, W. R.. MALPIGHIACEAE, IN: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, SOTHERS, A., C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO L. C. (Eds), **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. v. I. INPA-DFID, Manaus, 1999, p.505-511.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, 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**, Lavras, v.32, n.6, p.1754-1759, 2008.

2 OBJETIVOS GERAIS

Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de plantas de murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.), visando a micropropagação para atender a demanda em programas de reflorestamento e produção de mudas dessa espécie frutífera nativa do cerrado. Com o estabelecimento deste protocolo, será possível disponibilizar, em menor tempo, mudas selecionadas e livres de contaminação, para a implantação de pomares, oferecendo uma alternativa de geração de renda para o produtor e a preservação do ambiente natural, além da manutenção de um banco de germoplasma no Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde.

3 CAPÍTULO II: CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE MURICI (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.): ESTABELECIMENTO, DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO

3.1 RESUMO

Objetivou-se com este estudo, estabelecer um protocolo de germinação e cultivo *in vitro* de murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) a partir de embriões zigóticos. Para isso, foram feitos três ensaios: no ensaio I, testou-se a assepsia do embrião, nos tempos de exposição de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos no hipoclorito de sódio a 2,5% com e sem a imersão em álcool 70%. No ensaio II, para a germinação de embriões, testou-se os meios de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1981) nas concentrações de sais de 25, 50 e 100%, com e sem a adição de sacarose. No ensaio III, avaliou-se o crescimento de plântulas em meios de cultivo MS e WPM nas concentrações de sais de 25, 50 e 100%. Verificou-se que a imersão de 1 minuto em álcool 70% e 25 minutos em hipoclorito de sódio (2,5%) foi adequado para evitar contaminações não sendo fitotóxico para o embrião de murici. Para a germinação dos embriões, o meio de cultivo com água-ágar é o mais adequado e para o crescimento de plântulas é o meio de cultivo WPM 50%.

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecido, assepsia, meio de cultivo e frutífera do cerrado.

3.2 ABSTRACT

The objective of this study is to establish an *in vitro* germination and cultivation protocol for murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) using zygotic embryos. Therefore, three assays were performed: in assay I, embryo asepsis was tested at exposure times of 5, 10, 15, 20, 25, and 30 minutes in 2.5% sodium hypochlorite, with or without immersion in 70% alcohol; in assay II, MS (Murashige e Skoog, 1962) and wpm (Lloyd e McCown, 1981) culture media were tested at salt concentrations of 25%, 50%, and 100%, with or without the addition of sucrose, to germinate the buds; in assay III, seedling growth was evaluated in MS and WPM culture media at salt concentrations of 25%, 50%, and 100%. It was found that the sodium hypochlorite (2.5%) with the use of alcohol was 70% effective to avoid contamination is not phytotoxic to murici embryo.

For germination of embryos, the culture medium with water-agar is best suited and for plants growth is the culture medium of WPM 50%.

KEY WORDS: tissue culture, sterile, growth medium and fruitful in the cerrado.

3.3 INTRODUÇÃO

O murici (*Byrsonima* ssp.) é uma frutífera nativa do cerrado, dicotiledônea pertencente a família Malpighiaceae. Esta espécie arbórea produz frutos entre dezembro e março, nas regiões serranas do sudeste, nos cerrados de Mato Grosso e Goiás e no litoral do norte e nordeste do Brasil. Quando maduros tem coloração amarela e com diâmetro de 1,5 a 2 cm, com odor marcante, que o caracteriza como fruto de sabor e aroma exóticos (Alves & Franco, 2003; Rezende & Fraga, 2003; Guimarães & Silva, 2008).

Os frutos possuem alto valor nutricional sendo consumidos principalmente *in natura* ou na forma de sucos, licores, geleias, doces e sorvetes (Almeida et al., 1998, 2008; Figueiredo et al., 2005; Guimarães e Silva, 2008). As populações locais que vivem do extrativismo comercializam o murici em feiras livres e mercados locais (Gusmão et al., 2006), portanto ainda não existe um mercado formal.

A *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, é uma das espécies de murici, árvore de pequeno porte que tem potencial para a produção de alimento, madeira e na medicina popular (Gusmão et al., 2006; Sannomiya et al., 2005). São poucas as informações na literatura sobre as espécies de murici, tendo a necessidade de mais pesquisas para seu cultivo, que possam ingressar no mercado formal de frutas (Cavalcante et al., 2009).

As espécies de muricis, têm limitações quanto a propagação, uma vez que a germinação tem baixa porcentagem, é lenta e com acentuada desuniformidade (Carvalho e Nascimento, 2008; Nogueira et al., 2004). Isso ocorre em virtude dos embriões estarem envolvidos pelo espesso endocarpo, constituindo uma barreira mecânica, além disso, existe a hipótese de dormência fisiológica (Carvalho et al., 1998; Carvalho et al., 2007; Sautu et al. 2006; Sautu et al., 2007). Assim a remoção do endocarpo, a extração do embrião e a utilização das técnicas do cultivo de embriões, contribuem para a redução do tempo de germinação e permitem a produção de plantas livres de contaminantes. Apesar do cultivo *in vitro* ser um procedimento empregado na propagação de várias espécies, o conhecimento sobre essa técnica em fruteiras nativas do cerrado ainda é insuficiente (Ledo et al., 2007; Pinhal et al., 2011).

Uma alternativa importante é o cultivo de embriões *in vitro*, que pode ser utilizada como uma ferramenta para o cultivo de murici. Segundo Oliveira (2001), o cultivo de embriões reduz o tempo para a obtenção de um novo indivíduo, permite uniformidade, alto percentual de germinação, rápida multiplicação do material selecionado, antecipa a época de plantio e evita a destruição das plantas matrizes. Esta técnica tem sido utilizada para superar dormência de sementes, testar sua viabilidade e servir como fonte de explantes (Hu & Ferreira, 1998). Observa-se que as brotações oriundas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos, além de servirem como explantes, também formam raízes adventícias, o que permite o posterior transplantio das plântulas para condições *ex vitro* (Santos et al., 2005).

Um fator importante na cultura de embriões é a metodologia de uma assepsia eficiente, que diminui ao máximo os contaminantes do material (Corder & Borges Junior, 1999). A presença de microrganismos, sobretudo fungos e bactérias, podem afetar o vigor germinativo e promover plântulas mal formadas ou sua morte. Por isso o método adequado de assepsia é importante, sendo eficaz, para que a plântula sirva de fonte de explante livre de contaminações (Couto et al., 2004).

O meio de cultivo é outro fator importante para o bom crescimento de plântulas. Eles visam atender as necessidades da espécie estudada, fornecendo os nutrientes necessários para o seu crescimento *in vitro*. As exigências das plantas que são variáveis com a espécie, cultivar ou explante utilizado, deve ser experimentalmente definido para cada caso em particular. Por isso, a quantidade adequada de nutrientes e a relação osmótica são fatores que definirão a germinação e as etapas subsequentes do processo (Kanashiro et al., 2009). Segundo Ledo et al. (2007) e Sousa et al. (2007) os meios de cultivo mais encontrados em trabalhos de germinação *in vitro* de fruteiras são o MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1980).

Sob este contexto, verifica-se que a germinação de fruteiras nativas do Cerrado em um ambiente controlado, é um desafio devido aos diversos fatores que interferem na conservação e no seu crescimento, tais como a contaminação, falta de protocolos para o cultivo *in vitro*. Este processo se torna ainda mais difícil, quando necessita produzir mudas em grandes quantidades para escala comercial (Pinhal et al., 2011).

Diante desses fatos e em razão da falta de relatos sobre a propagação assexuada de *B. cydoniifolia* A. Juss., objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo de germinação e cultivo *in vitro* desta espécie, a partir de embriões zigóticos.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

O material vegetal utilizado na propagação *in vitro* foi retirado de frutos maduros de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss., coletados em novembro de 2010, no município de Goiânia – GO (S 16° 35.855' - W 049° 16.352'), altitude de 771 m (Figura 1 A-C). Os diásporos que consiste no endocarpo e semente foram cedidos pelo Centro de Treinamento da EMATER, localizada no *Campus* II da UFG (Universidade Federal de Goiás) em Goiânia-GO. Os diásporos ficaram armazenados em sacos de papel em temperatura ambiente até o início dos estudos, em janeiro de 2011.

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde. A exsicata do material vegetal está depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás *campus* Jataí, sob o número 5646.



Figura 1. Material Vegetal de *B. cydoniifolia* A. Juss.: (A) arbusto; (B) folhas e flores; (C) fruto. Rio Verde-GO, 2012. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

3.4.1 Ensaio I: Influência do tempo de imersão dos embriões zigóticos de *B. cydoniifolia* A. Juss. em solução de hipoclorito de sódio.

Os diásporos selecionados foram lavados com água corrente por 5 minutos. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio com teor de cloro ativo 2,5% (água sanitária comercial a 100%) durante 10 minutos e depois lavados com água destilada e autoclavada. O excesso de água dos diásporos foi retirado com papel toalha. Com o auxílio de morsa de mesa, os diásporos foram quebrados e os embriões foram retirados cuidadosamente com uma pinça para evitar injúrias físicas (Figura 2 A-C).



Figura 2. Material vegetal de *B. cydoniifolia* A. Juss.: (A) diásporos; (B) quebra do diásporo em morsa de mesa; (C) diásporo quebrado composto por dois embriões com tegumento. Partes do diásporo: (EN) endocarpo; (EB) embrião com tegumento. Rio Verde-GO, 2012. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

Para avaliar o efeito do agente desinfestante, os embriões permaneceram submersos em solução de hipoclorito de sódio com teor de cloro ativo de 2,5% (água sanitária comercial 100%), com a adição de três gotas de detergente Tween-20, nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, com e sem imersão em álcool 70% (v/v) por 30 segundos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foi feita a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada e os embriões foram inoculados em tubos de ensaios (25 x 150 mm) contendo 15 mL de meio água-ágar, fechados com tampa plástica. Para a solidificação do meio utilizou-se 3,5 g L⁻¹ ágar (Marca: Dinâmica®) e o pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem a 120° C, durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os embriões inoculados foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25±2 °C, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 45-55 μmol m⁻²s⁻¹, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes.

Diariamente foram feitas contagens para avaliar a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, e aos 30 dias, a porcentagem de germinação, o comprimento da parte aérea e raiz. Considerando germinados todos os embriões com protusão radicular.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x6 (presença e ausência de álcool x tempos de imersão em hipoclorito de sódio), e cada tratamento contendo 20 repetições cada uma, constituída por um tubo de ensaio, totalizando 240 unidades experimentais.

Os resultados expressos em porcentagem, foram transformados em arco seno (%)^{0.5}, e o restante em (x+1)^{0.5}. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente,

mediante à análise de variância com aplicação do teste F a 5% de probabilidade e as médias, analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2011).

3.4.2 Ensaio II: Germinação dos embriões zigóticos de *B. cydoniifolia* A. Juss. em diferentes meios de cultivo, acrescidos ou não de sacarose.

Para a excisão dos embriões de murici, utilizou-se a mesma técnica do ensaio anterior e a assepsia dos embriões foi utilizado a melhor metodologia obtida do ensaio (I). Os meios de cultivo utilizados foram MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM (Lloyd & McCown, 1981), com as concentrações de sais de 25, 50 e 100% de cada um, acrescidos ou não com 30 g L⁻¹ de sacarose e o tratamento controle com água-ágar. Para solidificação do meio, utilizou-se 3,5 g L⁻¹ ágar (Marca: Dinâmica®) e o pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Os embriões foram inoculados em tubos de ensaios (25 x 150mm) contendo 15 mL do meio de cultivo e mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25±2 °C, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 45-55 μmol m⁻²s⁻¹, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes.

Diariamente foram feitas contagens para avaliar a porcentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG) e aos 30 dias o comprimento da parte aérea. Os cálculos do IVG foram feitos segundo Maguirre (1962). Considerando germinados todos os embriões com protrusão radicular.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 20 repetições, cada uma, constituída por um tudo de ensaio, totalizando em 140 unidades experimentais. Os resultados expressos em porcentagem, foram transformados em arco seno (%)^{0.5} e o restante em (x+1)^{0.5}.

Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.4.3 Ensaio III: Cultivo de plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss. em diferentes meios de cultivo.

Utilizou-se como fonte de explante, plântulas com 30 dias de cultivo, provenientes de embriões zigóticos preestabelecidos *in vitro*. As folhas cotiledonares e as radículas das plântulas foram excisadas obtendo explantes de ± 1 cm de comprimento. Os explantes foram inoculados em frascos contendo 50 mL de meio MS e WPM nas concentrações de sais de 25, 50 e 100%, acrescidos com 30 g L^{-1} de sacarose. Para solidificação do meio, utilizou-se $3,5 \text{ g L}^{-1}$ ágar (Marca: Dinâmica) e o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,3$ antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos. Os frascos contendo os explantes inoculados foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Após 30 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de contaminação, o comprimento da parte aérea e número de folhas, e aos 60 dias, o comprimento da parte aérea e o número de folhas por plântula.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2×3 (meio de cultivo x concentrações de sais) e cada tratamento contendo 20 repetições, constituído por um tubo de ensaio, totalizando 120 unidades experimentais.

Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade de multiplicação *in vitro* de murici via embriões é aceitável visto que em todos os tratamentos houve a regeneração de plântulas.

Os embriões de murici possuem coloração branca amarelada e sua grande peculiaridade é a forma espiralada (Figura 3 A). Verificou que ao serem inoculados, caso a forma espiralada estivesse desconfigurada, a taxa de germinação diminui, o que compromete a regeneração. Por isso, é de suma importância que o tegumento esteja envolto no embrião no processo de desinfestação, isto porque é o tegumento que ajuda manter o seu formato e o mantém resguardado da exposição externa.

No processo de desinfestação, o tegumento tende a se danificar e são rompidos por completos, ficando os embriões livres. Desta forma, os embriões selecionados para a inoculação foram aqueles que mantiveram a forma espiralada.

Os embriões inoculados se mantiveram enrolados até o momento em que o processo de embebição foi o suficiente, para que por si só se desenrolassem iniciando a protrusão da radícula, que teve início após o 7^o dia de cultivo (Figura 3 B). Aos poucos as folhas cotiledonares dos embriões foram surgindo e gradativamente mudou a coloração, momento em que se iniciou o processo de enverdecimento, as clorofilas foram produzidas, tornando verdes. Este evento ficou mais evidente a partir do 14^o dia de cultivo *in vitro* (Figura 3 C).

Aos 30 dias de cultivo, obteve-se plântulas bem formadas, com coloração verde intenso, característico da espécie (Figura 3 D). Durante todo processo de germinação não houve oxidação dos explantes, nem a formação de calos e uma média de 85% de embriões germinados para todos os tratamentos.

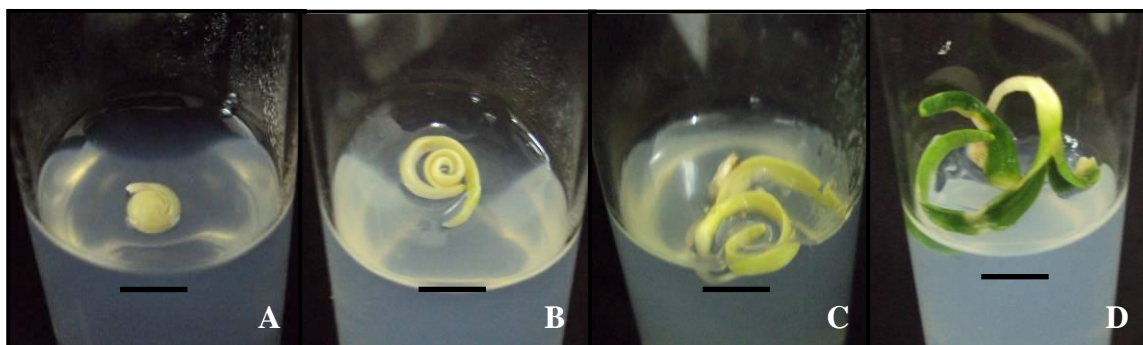


Figura 3. Germinação e crescimento *in vitro* de embrião zigótico de *B. cydoniifolia* A. Juss.: (A) embrião no 1^o dia de cultivo; (B) embrião com protrusão radicular aos 7 dias de cultivo; (C) formação de plântula aos 14 dias de cultivo; (D) plântula aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

3.5.1 Ensaios I: Influência do tempo de imersão dos embriões zigóticos de *B. cydoniifolia* A. Juss. em hipoclorito de sódio.

O modelo de regressão quadrática teve o melhor ajuste em resposta aos ensaios testados. Observou-se que a tendência foi obter menores taxas de contaminação quando o período de exposição dos embriões na água sanitária (hipoclorito de sódio 2,5%) foi maior, tanto daqueles que inicialmente foram submersos em álcool, quanto daqueles que

não foram. Verificou a utilização, com álcool 70% durante 1 minuto e água sanitária (hipoclorito de sódio 2,5%) durante 25 minutos, proporcionou bons resultados (Figura 4 A).

Constatou-se também, que independente da imersão dos embriões em álcool 70% quando estes foram submersos durante 5 minutos em água sanitária, as maiores porcentagens de contaminação, foram de 20% (Figura 4 A).

O ponto de máxima para contaminação (18,83%), foi obtido com o tempo de imersão de 7,99 minutos na água sanitária sem álcool e 37,55% quando imerso por 7,41 minutos em água sanitária com álcool.

Quanto ao comprimento médio da parte aérea, verificou-se que a medida que aumentou o tempo de imersão na água sanitária sem álcool ocorreu uma redução nos valores até chegar 20 minutos, e depois manteve a mesma tendência. Já na presença de álcool os valores foram semelhantes em qualquer tempo de imersão. A desinfestação feita somente com água sanitária por 5 minutos proporcionaram melhores resultados, o embrião cresceu 1,6 cm. Já para o ensaio em que foi submetido a combinação de álcool 70% e água sanitária por 5 minutos, a parte aérea do embrião cresceu 1,2 cm (Figura 4 B). O ponto de máxima para o comprimento médio da parte aérea (1,02 cm) foi obtido com o tempo de imersão de 31,25 minutos na água sanitária sem álcool e 1,16 cm com imersão em água sanitária com álcool no tempo de 8,67 minutos.

Com relação ao comprimento médio da raiz ocorreu uma redução dos valores a medida que aumentou o tempo da assepsia até 20 minutos, porém com 25 e 30 minutos foi observado um aumento dos valores (Figura 4 C).

Por ter bom desempenho com relação a todos os caracteres avaliados e para que se tenha eficiência na desinfestação de embriões de murici deve-se utilizar a imersão em álcool 70% durante 1 minuto, seguido de água sanitária (durante 25 minutos.

Diferentes tipos de metodologias para a assepsia de embriões de muricis são utilizados, como por exemplo o estudo de Nogueira et al. (2004) que trabalhando com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), utilizou álcool 70% por 30 segundos e em seguida solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 5 minutos para os embriões com tegumento, após a retirada do tegumento, foram novamente imersos em solução de hipoclorito de sódio 0.5% por 5 minutos. Já Castro et al. (2005), trabalhando com o murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich.) fez a assepsia somente dos diásporos, que foram desinfestados com hipoclorito de sódio comercial, a 2%, por 10 minutos, em seguida os embriões foram extraídos do endocarpo e inoculados em câmara de fluxo laminar.

O hipoclorito de sódio e álcool são dois agentes desinfestantes bastante utilizados em assepsia de sementes e embriões, com efeitos satisfatórios contra a contaminação fúngica e bacteriana.

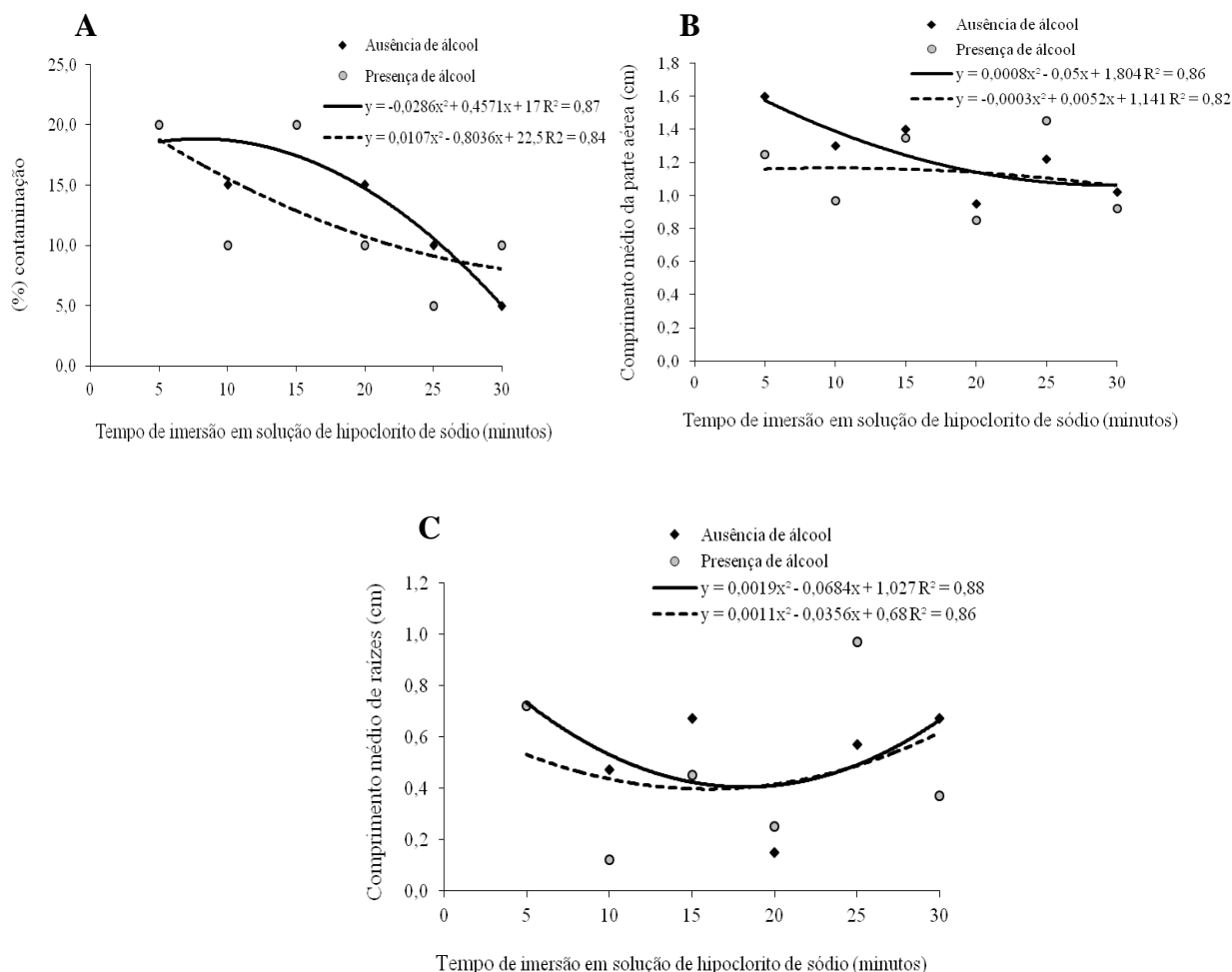


Figura 4. Assepsia de embriões zigóticos de *B. cydoniifolia* A. Juss. aos 30 dias de cultivo *in vitro*: (A) porcentagem de contaminação em função dos diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%); (B) comprimento médio da parte aérea em função da concentração de hipoclorito de sódio (2,5%); (C) comprimento médio de raízes em função da concentração de hipoclorito de sódio (2,5%). Rio Verde-GO, 2012.

3.5.2 Ensaio II: Germinação dos embriões zigóticos de *B. cydoniifolia* A. Juss. em diferentes meios de cultivo, acrescidos ou não de sacarose.

A assepsia utilizada de 1 minuto em álcool 70% combinado com água sanitária (hipoclorito de sódio 2,5%), por 25 minutos foi eficiente, manteve a integridade do embrião e não foi fitotóxico, desta forma, verificou-se que em todos os tratamentos houve a germinação dos embriões (Tabela 1).

Observou-se que a associação de sacarose aos diferentes tipos de concentrações de meio de cultivo, foram significativas para porcentagem de germinação e o comprimento da parte aérea. Para a contaminação e IVG, não houve significância (Tabela 1). Não houve significância para nenhuma das características analisadas quando se testou as concentrações e os tipos de meio de cultivo sem a adição de sacarose.

De modo geral, as maiores taxas de germinação ocorreram em função da redução da concentração dos sais dos meios de cultivo testados, sendo que a taxa de germinação esteve entre 45 a 95%. As menores taxas de germinação foram de 45 e 50% provenientes do meio MS 50 e 100% respectivamente (Tabela 1).

Avaliando o comprimento da parte aérea, verificou-se que houve a mesma tendência observada no estudo da porcentagem de germinação. Menores comprimentos da parte aérea nos tratamentos MS 50 e 100% com crescimento médio de 0,80 e 1,32 cm, respectivamente. Os demais tratamentos obtiveram médias de 1,58 a 2,17 cm. Para o comprimento de raiz, não houve diferença entre os meios testados, ficando para os meios sem sacarose uma média de 1,33 cm e os meios com sacarose de 1,15 cm (dados não mostrados).

Ainda nesta condição, observa-se que o meio preparado somente com água e ágar obteve sempre bons desempenhos com relação a todos os caracteres avaliados, revelando a possibilidade de germinação neste meio sem necessitar da inclusão de sais e sacarose. Esta possibilidade acarreta benefícios por diminuir os custos da produção final.

Tabela 1. Germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e média do comprimento da parte aérea de *B. cydonifolia* A. Juss. em função da concentração de sais do meio MS e WPM na ausência de sacarose e o tratamento controle água-ágar, aos 30 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.

Meio de cultivo	Germinação (%)	IVG	Comprimento da parte aérea (cm)
Água-ágar	95 a	7 a	2,17 a
MS 25% com sacarose	85 a	8 a	1,58 a
MS 50% com sacarose	45 b	8 a	0,80 b
MS 100% com sacarose	50 b	6 a	1,32 b
WPM 25% com sacarose	75 a	7 a	1,81 a
WPM 50% com sacarose	75 a	8 a	2,05 a
WPM 100% com sacarose	65 a	8 a	1,73 a

^zMédias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fisiologicamente, para o embrião germinar em meio ausente ou com pouco sais de nutriente, não há prejuízos, haja visto que o processo de germinação ocorre em razão das reservas nutricionais dos cotilédones, presentes nos embriões excisados, podendo estes utilizar ou não as fontes nutricionais presentes no meio de cultivo. Segundo Hu & Ferreira (1998), embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este são quase autotróficos e, em geral dispensa a suplementação de fonte de energia. Confirmando os resultados deste estudo, Ribeiro et al. (1998), em seu trabalho com embriões de laranja pera em que se testou diferentes concentrações de sacarose, observaram altos índices de sobrevivência dos embriões, em todos os níveis testados, evidenciando ser dispensável para a fase inicial do desenvolvimento dos embriões para a espécie em questão. Baixas concentrações de sacarose também são indicadas para a germinação de embriões zigóticos de murmuru (*Astro caryumulei*), concentrações abaixo de 15 g L^{-1} de sacarose são as mais indicadas (Pereira et al., 2006).

Discordando deste resultado, Castro et al. (2005), em seu estudo com (*Byrsonima verbascifolia* Rich.), recomenda a utilização de MS 100%, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos desta espécie. Já Nogueira et al. (2004), indica para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) os meios MS e WPM 50% sem sacarose.

3.5.3 Ensaio III: Cultivo de plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss. em diferentes meios de cultivo.

Em ensaios preliminares verificou-se que pelo formato do embrião, as plântulas crescem curvas e perdem o contato direto com o meio de cultivo, e é por isso que se faz necessário a excisão de parte das folhas cotiledonares e radiculares mantendo retilíneo o explante, facilitando a inoculação (Figura 5 A-C).

A excisão das folhas cotiledonares e da radícula permite que as folhas primárias surjam com mais rapidez. Outro fato importante é que o eixo central do explante deve ficar inoculado acima do meio de cultivo, a sua sobreposição não permite o crescimento dos novos pares de folhas o que conseqüentemente leva a perda do material vegetal (Figura 5 D).

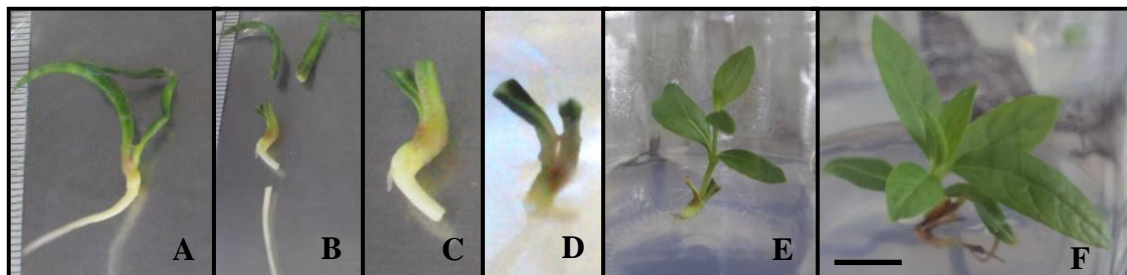


Figura 5. *B. cydoniifolia* A. Juss.: (A) Plântula aos 30 dias de cultivo *in vitro*; (B-C) plântula com excisão nas folhas dicotiledonares e na radícula; (D) plântula excisada, em meio de cultivo; (E) plântula aos 30 dias de cultivo; (F) plântula aos 60 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, verificou-se que em todos os tratamentos houve a formação de plântulas bem formadas de coloração verde intenso característico da espécie. Não houve oxidação e nem a formação de calos (Figura 5 E). Para as concentrações testadas, o meio WPM propicia melhores resultados, sendo observadas as melhores respostas quando utilizadas as concentrações de 25 e 50%, médias de 2,95 e 3,50 cm respectivamente (Tabela 2).

Quanto ao número de folhas por plântula, também não houve significância entre os meios utilizados (Tabela 2). Verificou-se que o meio MS a 25% produziu o menor número de folhas, média de 3,25. As concentrações testadas no meio WPM foram as quais se obtiveram melhores respostas, com médias de 4,57; 5,30 e 5,90 para as concentrações de 100, 25 e 50% respectivamente.

Tabela 2. Comprimento da parte aérea (cm), da raiz (cm) e o número de folhas por plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss. em relação : à concentração de sais do meio MS e WPM, aos 30 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.

Concentração	Tipos de meio de cultivo	
	MS	WPM
	Comprimento da parte aérea (cm), aos 30 dias de cultivo	
25%	1,81 Ab ^z	2,95 Aa
50%	2,09 Ab	3,50 Aa
100%	2,27 Aa	2,50 Aa
	Número de folhas por plântula, aos 30 dias de cultivo	
25%	3,25 Ab	5,30 Aa
50%	4,62 Aa	5,90 Aa
100%	4,27 Aa	4,57 Aa

^zMédias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna e minúscula em cada linha, não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Aos 60 dias, verificou-se que houve crescimento da parte aérea de até 131,42%, em relação aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Quando avaliado o tipo de meio de cultivo, não foi constatado significância (Tabela 3). No meio WPM as concentrações não se diferenciaram, mas proporcionaram as maiores médias 3,78; 4,40 e 4,60 cm. Nas concentrações de 100; 25 e 50% respectivamente.

Já para o número de folhas por plântula, houve significância entre os tipos de meio de cultivo. O meio WPM 100% propiciou o menor número de folhas por plântula, média de 5,71 (Tabela 3).

Já para o número de folhas por plântula, houve significância entre os tipos de meio de cultivo. O meio WPM 100% propiciou o menor número de folhas por plântula, média de 5,71 (Tabela 3).

Pelos resultados obtidos, em geral o meio de cultivo WPM em concentrações mais baixas proporcionaram melhores resultados para as características avaliadas, recomendando a utilização do meio WPM 50%.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), meios de cultivo com composição mais diluída em macronutrientes, proporcionam melhores resultados para espécies lenhosas.

Tabela 3. Comprimento da parte aérea (cm) e número de folhas por plântula de *B. cydoniifolia* A. Juss. em relação à concentração de sais do meio MS e WPM, aos 60 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.

Concentração	Tipos de meio de cultivo	
	MS	WPM
	Comprimento da parte aérea (cm), aos 60 dias de cultivo	
25%	3,00 Ab ^z	4,40 Aa
50%	2,93 Ab	4,60 Aa
100%	2,75 Aa	3,78 Aa
	Número de folhas por plântula, aos 60 dias de cultivo	
25%	8,28 Aa	10,00 Aa
50%	7,28 Aa	8,90 Aa
100%	7,50 Aa	5,71 Ba

^zMédias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna e minúscula em cada linha, não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Dados semelhantes foram obtidos por Mello et al. (1999), que constataram a superioridade do meio de cultivo WPM em relação ao MS e DKW no estabelecimento *in vitro* de acerola (*Malpighia emarginata* DC.), observando que os melhores resultados foram obtidos pelos explantes inoculados em meio WPM. No trabalho de Silva et al., (2006), o meio de cultivo WPM também foi o que proporcionou melhor resultado no estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv Delite (*Vaccinium ashei* Reade).

Pelos resultados obtidos, em geral o meio de cultivo WPM em concentrações mais baixas proporcionaram melhores resultados para as características avaliadas, recomendando a utilização do meio WPM 50%.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), meios de cultivo com composição mais diluída em macronutrientes, proporcionam melhores resultados para espécies lenhosas.

A superioridade dos resultados obtidos com o meio de cultivo WPM pode ser explicada por ser composta por 25% das concentrações de íons nitrato de amônia do meio MS, e possuir maior concentração de potássio e um alto nível de íons sulfato, sendo utilizado amplamente no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, que possui menor exigência nutricional (Pasqual, 2001).

Pelos resultados desses experimentos, observa-se que o cultivo *in vitro* de embriões de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.), é possível, mesmo com algumas dificuldades, como a excisão do embrião do diásporo, sem causar injúrias físicas. No geral os meios de cultivos com concentrações mais baixas de sais proporcionaram os melhores resultados nas características avaliadas.

3.6 CONCLUSÕES

- A assepsia de embriões de *B. cydoniifolia* A. Juss. deve ser feita utilizando álcool 70% durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2,5) durante 25 minutos.
- Para germinação dos embriões de *B. cydoniifolia* A. Juss. o meio de cultivo mais adequado é o preparado com água e ágar, permanecendo neste durante 30 dias.
- Para o crescimento de plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss. o meio de cultivo mais adequado é o WPM 50%.

3.7 AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a FAPEG, a CAPES, programa PIBIC, IFGoiano *campus* Rio Verde pelo auxílio financeiro e ao Centro de Treinamento da EMATER pelo fornecimento do material vegetal.

3.8 REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, S. P., T. S. A. COSTA e J. A. SILVA. Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes, p. 351-381. In: S. M. SANO, S. P. ALMEIDA e J. F. RIBEIRO, (Eds), **Cerrado:** ecologia e flora, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2008..

ALVES, G. L.; FRANCO, M. R. B. Headspace gas chromatography–mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). **Journal of Chromatography**, v. 985, n. 4, p. 297-301, 2003.

CASTRO, A. H. F.; ALVARENTA, A. A.; PAIVA R.; GOMES, G. A. C. Propagação do murici (*Byrsonima verbascifolia*) por cultivo *in vitro* de embriões. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras, MG, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2005.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Caracterização dos pirênios e métodos para acelerar a germinação de sementes de murici do clone Açú. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.3, p.775-781, 2008.

CARVALHO, J.E.U. de; NASCIMENTO, W.M.O. do; MULLER, C.H. Propagação do Murucizeiro (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich.). In: CARVALHO, J.E.U. de; NASCIMENTO, W.M.O. do; MULLER, C.H. Produção de mudas de espécies frutíferas nativas da Amazônia. **Fortaleza: Instituto Frutal**, p. 87-99, 2007.

CAVALCANTE, T. R. M. e R. V. NAVES; E. V. FRANCESCHINELLI; R. P. SILVA. Polinização e formação de frutos em araticum. *Bragantia* 68: 13-21, 2009.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de Mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 28, n.5, p. 633-642, 2004.

CORDER, M. P. M. e BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wild. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, M. E., D. C. MICHELIN, M. SANNOMIYA, M. A. SILVA, L. C. SANTOS, L. F.R. ALMEIDA, A. R. M. SOUZA BRITO, H. R. N. SALGADO e W. VILEGAS. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**. 41: 79-83, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH**, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUIMARÃES, M. M. e M. S. SILVA. Valor nutricional e características químicas e físicas dos frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 28:817-821, 2008.

GUSMÃO, E. F. A. VIEIRA e E. M. FONSECA JÚNIOR. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Cerne** 12: 84-91, 2006.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇALVES, A. N.; DEMÉTRIO, V. A.; JOCYS, T.; TAVARES, A. R. Effect of calcium on the *in vitro* growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith plantlets. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v.32, p.867-877, 2009.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. *In vitro* embryology of *Ilex*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA-SPI; EMBRAPA CNPH**, v. 2, p. 371-393, 1998.

LEDO, 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 cultivo *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, 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. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 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.

MELLO, N. F.; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B. FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). Lavras, MG: **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.1, p. 102-107, 1999.

MURASHIGE T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 28, n. 5p. 1053-1059, set. outr., 2004.

OLIVEIRA, A. F. Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). 2001. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, p 121, 2001.

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**, Santa Maria 2011.

REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 14, n. 3, p. 425-428, 2003.

RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; VICHATO, M.; SANÁBIO, D. Cultivo *in vitro* de embriões de Laranja “Pera”: concentrações do meio MS e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n.4, p. 429-434, 1998.

SANNOMIYA, M., D. C. MICHELIN, C. M. RODRIGUES, L. C. SANTOS, H. R. N. SALGADO, C. A. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Revista Ciência Farm. Básica Apl.** 26: 71-75, 2005.

SANTOS, C. G. dos; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; SANTANA, J. R. F de; PEREIRA, A. B. Propagação de *coffea arabica* c.v. acaíá Cerrado por meio do cultivo *in vitro* de embriões. **Plant Cell Culture & Micropropagation.**, Lavras, MG, v. 1, n. 1, p. 19-23, 2005.

SAUTU, A.; BASKIN, J.M., BASKIN, C.C.; CONDIT, R. Studies on the biology of 100 native species of trees in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central Americ. Maryland, **Forest Ecology Management**, Amsterdam, v. 234, p. 245-263. 2006.

SAUTU, A.; BASKIN, J.M., BASKIN, C.C.; DEAGO, J.; CONDIT, R. Classification and ecological relationships of seed dormancy in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central America. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 17, p. 127-140. 2007.

SILVA, L. C. S.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; 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. Pelotas, SP: **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, n.4, p. 405-408, 2006.

SOUSA, C. da S.; MOREIRA, A. J. S.; BASTOS, L. P.; COSTA, M. A. P. de C.; ROCHA, M. A. CH. da; HANSEN, D de S. Germinação e indução de brotações *in vitro* utilizando diferentes reguladores vegetais em mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.276-278, 2007.

4 CAPÍTULO III: SACAROSE E VOLUME DO MEIO DE CULTIVO NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE MURICI (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.)

4.1 RESUMO

No bioma cerrado o murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) é uma importante espécie frutífera que tem propagação lenta e desuniforme. O cultivo *in vitro* é uma alternativa para a produção de mudas em menor tempo, com uniformidade e livre de contaminantes. Objetivou-se com este trabalho, testar a concentração mais adequada de sacarose e o volume do meio de cultivo no crescimento *in vitro* de murici. No ensaio I, utilizou-se diferentes concentrações de sacarose (0; 10; 20; 30; 40; 50 e 60 g L⁻¹) e para o ensaio II, testou-se diferentes volumes do meio de cultivo (10; 15; 20; 25 e 30 mL). O meio de cultivo utilizado foi WPM com a metade das concentrações de sais. Após 60 dias de cultivo, avaliou-se o comprimento médio da parte aérea (cm), o número médio de folhas expandidas e de gemas por explante e o comprimento médio de raízes (cm). A adição de sacarose no meio de cultivo, favoreceu o crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss., a quantidade de 50 g L⁻¹ de sacarose foi a mais adequada. O volume de meio de 15 a 25 mL, proporcionaram as melhores respostas no cultivo *in vitro* dessa espécie.

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecido, carboidrato, frutífera do Cerrado.

4.2 ABSTRACT

In the cerrado biome murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) is an important fruit species that spread slow and uneven. The *in vitro* is an alternative for the production of seedlings in less time, uniform and free of contaminants. The objective of this study was to test the most suitable sucrose concentration and volume of culture medium on *in vitro* growth of murici. In the essay I, were used different concentrations of sucrose (0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 g L⁻¹) and II for the test, were tested different volumes of culture medium (10, 15, 20, 25 and 30 mL). The culture medium used was WPM with half of salt concentrations. After 60 days of culture, were evaluated the average length of shoots (cm), the average number of expanded leaves, buds per explant and average root length (cm). The addition of sucrose in the medium favored the *in vitro* growth of *B. cydoniifolia* A. Juss., the amount of 50 g L⁻¹ sucrose in the culture

medium was the most appropriate. The volume of medium from 15 to 25 mL gave the best responses for *in vitro* cultivation of this species.

KEY WORDS: tissue culture, carbohydrate, fruit of the cerrado.

4.3 INTRODUÇÃO

O cerrado, é formado por uma grande biodiversidade de espécies, tanto da fauna quanto da flora, representando cerca de 30% da biodiversidade do Brasil e o segundo maior bioma brasileiro, com vegetação diferenciada, desde campos abertos até florestas (Aguiar & Camargo, 2004). Entretanto, a expansão agrícola sobre o Cerrado, tem afetado a vegetação nativa, de múltiplos potenciais, como na utilização medicinal ou alimentar (Machado et al., 2004; Klink & Machado, 2005), o que torna esse bioma uma região de grande valor biológico para ser preservado (Horta et al., 2002; Meyers et al., 2000).

O murici é uma espécie nativa do cerrado, que produz frutos que são consumidos *in natura* ou utilizados na forma de sucos, licores, geleias, doces e sorvetes, além disso, há relatos de sua utilização na medicina popular (Almeida et al., 2008; Figueiredo et al., 2005; Guimarães e Silva, 2008). Esta espécie tem fruto do tipo drupa e sua propagação se faz via sexuada. Entretanto, o murici tem alguns obstáculos para a germinação, as sementes têm baixa porcentagem de germinação e crescimento lento. O comprimento médio de uma árvore de murici, não ultrapassa 1,5 m após 2 anos de plantio, em condições de campo (Lorenzi, 1998; 2002).

Diante do exposto, tornam-se relevantes a busca de alternativas de propagação que propiciem a produção de mudas. O cultivo *in vitro* é uma alternativa para diversas espécies frutíferas com dificuldade para se propagar. Essa técnica também pode ser utilizada para as espécies nativas do cerrado, proporcionando a formação de pomares com populações de plantas homogêneas além de acelerar os métodos de propagação convencional (Souza et al., 2007).

No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte externa de carboidratos. De acordo com Yamada et al. (1978); Barz & Hüsemann (1982), em condições *in vitro*, as células das plântulas não têm capacidade de suprir os carboidratos necessários para seu

crescimento. A determinação da melhor fonte e concentração de carboidrato depende da espécie vegetal e da fase do processo de micropropagação (Nicoloso et al., 2003).

O carboidrato mais utilizado nos meios de cultivo é a sacarose, sendo a fonte de energia que proporciona altas taxas de crescimento, na maioria das espécies (Jesus et al., 2011). A sacarose também influencia o crescimento celular e a morfogênese, por meio de propriedades osmóticas (George et al., 2008).

Além do carboidrato, o volume de meio de cultivo, influencia o espaço e o ar interno do recipiente, que são utilizados pela planta (Pereira et al., 2006). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), esses fatores afetam diretamente a área superficial do meio de cultivo e atmosfera, como volume de ar sobre o meio de cultivo e a composição da fase gasosa do frasco. Estes fatores afetam o crescimento dos explantes e das plantas nos cultivos *in vitro*.

Assim, verifica-se a necessidade de aprimoramento do cultivo *in vitro* para essa espécie de murici, visando ter um protocolo para a produção de mudas em grande quantidade e de alta qualidade. Nesse sentido, objetivou-se com este trabalho, testar a concentração mais adequada de sacarose e o volume do meio de cultivo no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde. A exsiccata do material vegetal está depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás *Campus* Jataí, sob o número 5646.

Utilizou-se como fonte de explante, plântulas preestabelecidas *in vitro*, com 30 dias de cultivo, provenientes de embriões zigóticos. As folhas cotiledonares e a radícula das plântulas foram excisadas, obtendo segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento.

4.4.1 Ensaio I: Utilização de diferentes concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios (25 X 150 mm) contendo 20 mL do meio de cultivo WPM (Lloyd & McCown, 1980), com a metade das

concentrações de sais, acrescidos com 0; 10; 20; 30; 40; 50 e 60 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 3,5 g L⁻¹ de ágar (Marca: Dinâmica). O pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem a 120° C, durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os segmentos nodais inoculados foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25±2 °C, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m⁻²s⁻¹, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Após 60 dias de cultivo, avaliou-se o comprimento médio da parte aérea (cm), o número médio de folhas expandidas e de gemas por explante e o comprimento médio de raízes (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos, com 20 repetições, cada uma constituída por um tudo de ensaio, totalizando em 140 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade e as médias foram analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2011).

4.4.2 Ensaio II: Uso de diferentes volumes do meio de cultivo no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios (25 X 150 mm) contendo 10; 15; 20; 25 e 30 mL do meio de cultivo WPM (Lloyd & McCown, 1980), com a metade das concentrações de sais, acrescidos com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 3,5 g L⁻¹ de ágar (Marca: Dinâmica). O pH foi ajustado para 5,7±0,3 antes da autoclavagem a 120° C, durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os segmentos nodais inoculados foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25±2 °C, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m⁻²s⁻¹, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Após 60 dias de cultivo, avaliou-se o comprimento médio da parte aérea (cm), o número médio de folhas expandidas e de gemas por explante e o comprimento médio de raízes (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e com 20 repetições, cada uma constituída por um tudo de ensaio, totalizando em 100 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade e as médias foram analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2011).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Ensaio I: Utilização de diferentes concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

O modelo de regressão quadrático teve melhor ajuste para este ensaio. Observou-se que com menores quantidades de sacarose obteve-se menores valores de todas as características avaliadas, e a medida que aumentou a concentração de sacarose, aumentou os valores das características, até atingir 30 g L⁻¹ (ponto ótimo), com posterior diminuição dos valores (Figura 1).

Verificou-se também que níveis muito baixos ou muito elevados de sacarose, resultaram em menores valores de todas as características avaliada.

As características de crescimento em função da concentração de sacarose se comportaram da seguinte maneira: plântulas com maior comprimento ocorreu em, 27,89 g L⁻¹ (Figura 1 A), o maior número de folhas em 29,49 g L⁻¹ (Figura 1B), o maior número de gemas em 28,86 g L⁻¹ (Figura 1 C) e o maior número médio de raízes por plântula em 39,39 g L⁻¹ (Figura 1 D).

Portanto, a utilização de 30 g L⁻¹ de sacarose foi a mais adequada para o cultivo *in vitro* de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.).

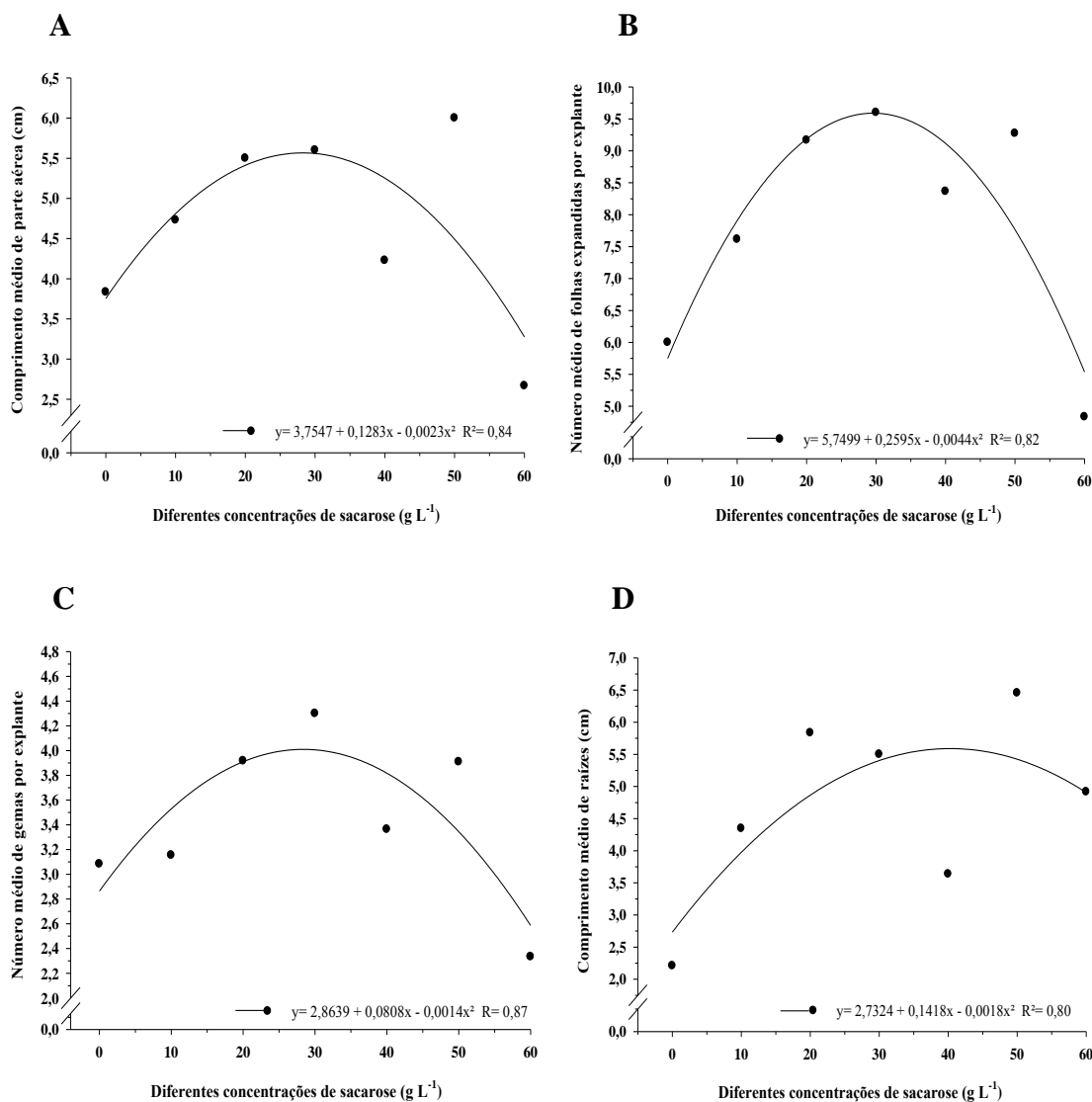


Figura 1. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes concentrações de sacarose, avaliadas aos 30 dias: (A) comprimento médio da parte aérea (cm); (B) número médio de folhas por explante; (C) número médio de gemas por explante; (D) comprimento médio de raízes (cm). Rio Verde-GO, 2012.

Visualmente foi verificado que a sacarose teve influência no crescimento dos explantes e principalmente do sistema radicular, os tratamentos com a adição de sacarose tinham raízes bem desenvolvidas, com muitas ramificações, se comparado ao tratamento ausente de sacarose (Figura 2).

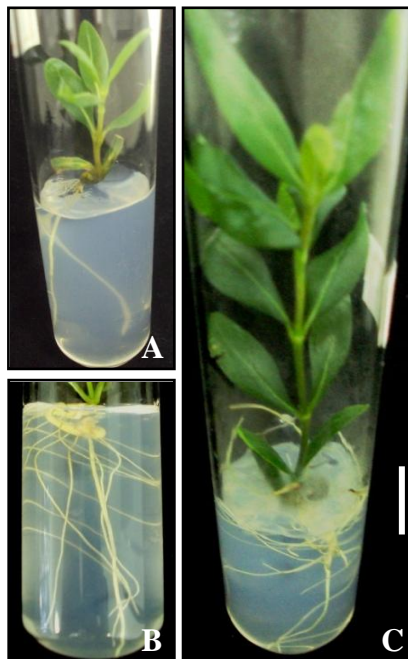


Figura 2. Plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss., aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose: (A) meio de cultivo na ausência de sacarose; (B) detalhe da formação do sistema radicular no meio de cultivo com 30 g L⁻¹ de sacarose; (C) formação da parte aérea no meio de cultivo com 30 g L⁻¹ de sacarose. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

A sacarose é essencial fonte de energia, e neste caso estimulou o crescimento das raízes. Os dados obtidos são concordantes com afirmações de vários autores de que a presença de carboidrato é essencial para o enraizamento *in vitro* de muitas espécies (Grattapaglia e Machado, 1998; Leite et al, 2000).

De maneira geral, a adição de sacarose no meio de cultivo, favoreceu o crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss. Segundo Fuentes et al. (2007), menores proporções de sacarose no meio de cultivo podem melhorar a fotossíntese de plantas, porém podem afetar negativamente o seu crescimento durante o cultivo *in vitro*.

Por outro lado, níveis muito elevados de sacarose como 60 g L⁻¹, prejudicou o crescimento da espécie em estudo. Segundo Maldaner et al. (2006), altas concentrações de sacarose, afetam negativamente o cultivo *in vitro*, com o aumento do potencial osmótico do meio, fator conhecido como inibidor do crescimento. Porém, algumas espécies necessitam de concentrações mais elevadas de sacarose, como o exemplo da *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen, em que o crescimento foi estimulado, quando se utilizou as concentrações de 45 a 60 g L⁻¹ de sacarose no cultivo *in vitro* (Skrebsky et al., 2004). A amoreira preta cv. Tupy, também teve aumento da biomassa com o

número de raízes, quando adicionado 60 g L⁻¹ de sacarose (Villa et al., 2009). Resultados semelhantes foi observado no cultivo de *Oncidium varicosum* Lindl., em que 60 g L⁻¹ de sacarose foi a melhor fonte e concentração de carboidrato para todas as características avaliadas (Rego-Oliveira et al., 2003).

4.5.2 Ensaio II: Uso de diferentes volumes do meio de cultivo no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

Os diferentes volumes utilizados neste ensaio foram significativos apenas para o comprimento médio da parte aérea e de raízes. Para o número de folhas e gemas, a quantidade de meio não influenciou no crescimento de *B. cydoniifolia* A. Juss.

Para o crescimento médio da parte aérea, menores quantidades de meio de cultivo (10 mL) proporcionaram menores valores da parte aérea (4,5 cm), a medida que aumentou a quantidade de meio, a partir de 15 mL, o comprimento da parte aérea também aumentou, chegando ao valor máximo quando utilizou-se 20,13 mL de meio de cultivo, posteriormente houve redução. Observou-se que quando se utilizaram as quantidades extremas, como 10 mL ou 30 mL de meio de cultivo, foram atingidos os menores valores (4,54 e 4,61 cm) respectivamente (Figura 3 A). Para o comprimento médio de raízes, obteve-se o mesmo comportamento, o volume de 10 mL, proporcionou o menor comprimento de raízes (4,66 cm). A medida que aumentou o volume do meio, houve um acréscimo no comprimento médio, atingindo o valor máximo de raízes (8,31), quando utilizou 20,55 mL de meio de cultivo. A partir desse valor, houve um decréscimo no comprimento de raízes (7,70 e 5,30 cm), com o aumento do volume do meio (25 e 30 mL respectivamente) (Figura 3 B).

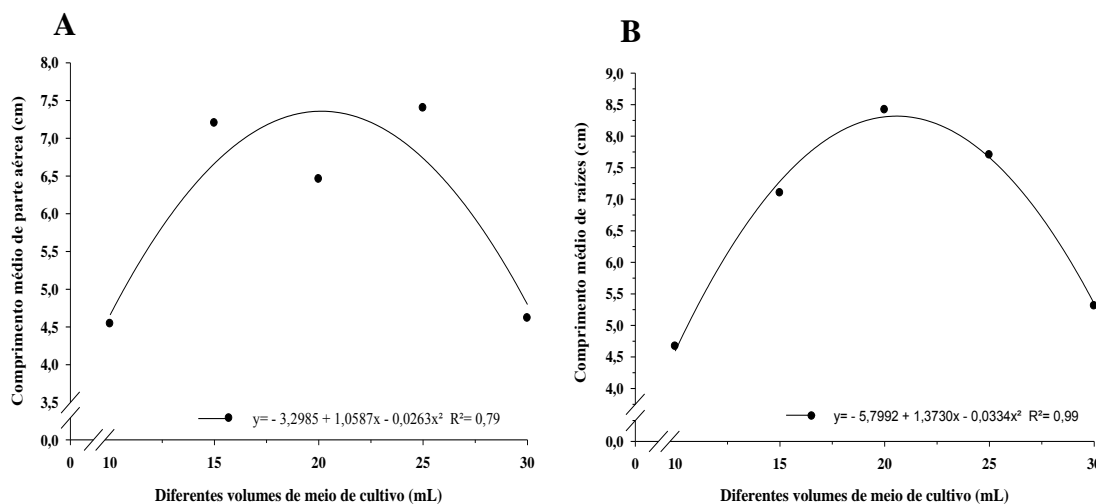


Figura 3. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes volumes de meio de cultivo (mL), avaliadas aos 60 dias: (A) comprimento médio da parte aérea (cm); (B) comprimento médio de raízes (cm). Rio Verde-GO, 2012.

Observou-se que, tanto para o comprimento médio da parte aérea quanto para o comprimento de raízes, o volume de meio mais adequados para o crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss., foi de 20 mL (Figura 4). Conforme os resultados obtidos neste estudo, tanto a menor quantidade de meio (10 mL), quanto a maior quantidade (30 mL), proporcionaram os menores valores. Provavelmente isso ocorreu, por conter pouco meio (10 mL) e conseqüentemente pouca água para a planta crescer normalmente, já em relação a maior quantidade de meio (30 mL), provavelmente a parte superior dentro do tubo de ensaio, espaço que fica a parte aérea da planta, ficou muito pequeno, dificultando as trocas gasosas.

Resultados de outros autores, revelam que a quantidade de meio de cultivo é específica para cada espécie. Segundo Pereira et al., (2006), observaram que o aumento do número de brotos de curauá (*Ananas erectifolius* LB Sm.) é proporcional ao aumento do volume de meio de cultivo. Da mesma forma, o volume de meio também influenciou no crescimento *in vitro* de *Melissa officinalis* L., a medida que aumentou o volume de meio, elevou o número de nós e comprimento do broto (Reis et al., 2007). Já na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* Stokes), os autores obtiveram os melhores resultados com os volumes de 30 e 40 mL (Reis et al., 2004).

Portanto, acredita-se que determinando a quantidade de meio de cultivo que se deve utilizar para cada espécie, além de influenciar o crescimento da planta, contribui para a economia do material utilizado, uma vez que se utilizará apenas o necessário para promover o máximo crescimento.

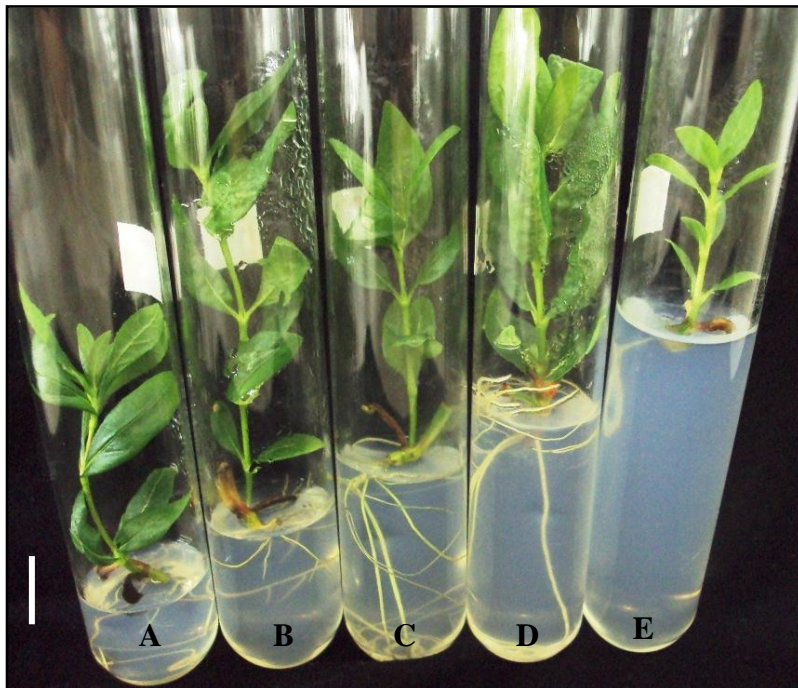


Figura 4. Plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss., aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes volume de meio de cultivo: (A) 10 mL; (B) 15 mL; (C) 20 mL; (D) 25 mL e (E) 30 mL. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

4.6 CONCLUSÕES

- A utilização de 30 g L⁻¹ de sacarose foi a mais adequada para o cultivo *in vitro* de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.).
- O volume de 20 mL do meio de cultivo, foi o mais indicado para o cultivo *in vitro* dessa espécie.

4.7 AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a FAPEG, a CAPES, programa PIBIC, IFGoiano *campus* Rio Verde, pelo auxílio financeiro e ao Centro de Treinamento da EMATER pelo fornecimento do material vegetal.

4.8 REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.M.S.; CAMARGO, A.J.A. **Cerrado**: ecologia e caracterização. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 249p.

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

ALMEIDA, S. P.; COSTA, T. S. A.; SILVA, J. A. Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds), **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF, Embrapa Informação Tecnológica. 2008, p.351-381.

BARZ, W.; HÜSEMANN, W. Aspects of photoautotrophic cell suspension cultures. In: FUJIWARA, A. **Plant tissue culture**. Tokio, Maruzen, p.245-248, 1982.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, M. E.; MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M. A.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, L. F. R.; SOUZA BRITO, A. R. M.; SALGADO H. R. N.; VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, São Paulo, v.41, n.1, p.79-83, 2005.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; ESPADAS, F.; QUIROZ, A.; AGUILAR, M.; COELHO, J.; SANTAMARIA, J.M. Manipulation of abiotic *in vitro* factors to improve the physiology and subsequent field performance of micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.748, p.77-86, 2007.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrech: Background, 3ed., 2008, 501p.

GUIMARÃES, M. M.; SILVA, M. S. Valor nutricional e características químicas e físicas dos frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p.817-821, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v.1, 1998, p.183-260.

HORTA, A.; DIAS, B.; SANTO, C.V.E.; COSTA, C. R.; FURLANI, C.; HERMANN, G.; FONSECA, G. A. B.; OLIVEIRA, H.; CORADIN, H.; PINTO, R. P.; FILHO, L. C. R.; PÁDUA, M. T. J.; PEREIRA, P. G. P., CAVALCANTI, R. B.; MAGALHÃES, R.; OLIVERIA, S. (Org.). **Cerrado e Pantanal**. In: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002. p. 175-214.

JESUS, A. M. S.; VILLA, F.; LARA, C. C.; PASQUAL, M. Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v.58, n.6, p. 679-684, 2011.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A **Conservação do Cerrado brasileiro, Megadiversidade**, v.1, n.1, 2005, p.147-155.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L.; Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH x F971. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, 2000.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, v.2, 2.ed.,1998, 352p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Nova Odessa, v.1, 2002, p.386.

MACHADO, R. B.; M. B. RAMOS NETO, P. G. P.; PEREIRA, E. F.; CALDAS, D. A.; GONÇALVES, N. S.; SANTOS, K.; TABOR e M. STEININGER. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Conservação Internacional, Brasília, DF, 2004.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. T. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1201-1206, 2006.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, fev. 2000.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeitos de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; RODRIGUES, H. C. A.; ROSADO, L. D. S.; BEIJO, L. A.; LAMEIRA, A. O. Proliferação *in vitro* de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio de cultura. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.2, n.2, p.102- 106, 2006.

REGO-OLIVEIRA, L. D.; FARIA, R.T., FONSECA, I.C.; SACONATO, C. Influência da concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchi-daceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, p.265-272, 2003.

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

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**, Lavras, 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. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.3, n.2, p.83-88, 2007.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. da, FERRI, J.; SOARES, G. C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n. 1, p. 115-118, 2007 .

VILLA, F.; FRÁGUAS, C. B.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Micropropagação *in vitro* da amoreira-preta em diferentes meios. **Revista Ceres**, Viçosa, v.51, n.296, p.485-493, 2004.

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

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.19, n.4, p.691-699, 1978.

5 CAPÍTULO IV: CULTIVO *IN VITRO* DE MURICI (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.): AJUSTE DO pH E CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES MINERAIS

5.1 RESUMO

O murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss) é uma frutífera de pequeno porte que faz parte do bioma cerrado e tem grande importância na medicina popular, na produção de alimentos e de lenha. Esta espécie tem dificuldades para a reprodução, e tem no cultivo *in vitro*, uma alternativa para sua melhor propagação. Para avaliar as exigências nutricionais de *B. cydoniifolia* A. Juss., uma espécie adaptada ao cerrado, objetivou-se avaliar o pH e a nutrição do meio de cultivo, visando sua melhor adaptação *in vitro*. Utilizou-se o meio de cultivo WPM com 50% das concentrações dos sais, para os dois ensaios. Com relação ao pH, foram testados os valores iniciais de 4,0 a 6,0 (com intervalos de 0,5) e em relação aos nutrientes, foram utilizados 0,0; 1,7; 17 e 170 g L⁻¹ para o KH₂PO₄ e 0,0; 3,7; 37 e 370 g L⁻¹ para o MgSO₄.7H₂O. Por meio dos resultados obtidos, observou-se que o valor do pH 5,0 foi o mais indicado para o cultivo *in vitro* de murici. O KH₂PO₄ proporcionou o melhor resultado para o comprimento médio da parte aérea, com a concentração de 170 g L⁻¹. Já para MgSO₄.7H₂O, a concentração de 37 g L⁻¹, foi a mais adequada para o número de folhas expandidas, gemas e raízes por explante.

PALAVRAS-CHAVE: fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio, nutrição *in vitro*.

5.2 ABSTRACT

The murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss) is a small fruit that is part of the cerrado biome and has great importance in folk medicine, food production and firewood. This species has difficulty playing, and has *in vitro* culture, an alternative for better spread. To assess the nutritional requirements of *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss., a species adapted to the cerrado, it was evaluated the nutrition and the pH of the medium, aiming at their better adaptation *in vitro*. There were used the WPM culture medium with 50% of the salts concentrations, for the two tests. With respect to pH, the initial values were tested from 4.0 to 6.0 (at intervals of 0.5) and in nutrient levels, were used 0.0, 1.7, 17 and 170 g L⁻¹ for the KH₂PO₄ and 0.0, 3.7, 37 and 370 g L⁻¹ to MgSO₄.7H₂O. Through the results, it was observed that the pH value of 5.0 was the best

for the *in vitro* culture of murici. The KH_2PO_4 , provided the best result for the average length of shoot, with a concentration of 170 g L^{-1} . As for $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, the concentration of 37 g L^{-1} , was the most suitable for the number of expanded leaves, buds and roots per explant.

KEY WORDS: pH, potassium phosphate monobasic, magnesium sulfate, nutrition *in vitro*.

5.3 INTRODUÇÃO

O bioma cerrado é o segundo maior bioma do Brasil e ocupa uma área de 204 milhões de hectares (Souza & Lobato, 2004). Possui uma grande biodiversidade vegetal com cerca de 10 mil espécies de plantas dos quais 4400 seriam endêmicas, correspondendo a 1,5% da flora mundial (Myers et al., 2000). Um dos fatores que determina a vegetação desse bioma, é o solo, que se caracteriza por ser profundo, bem drenado, com intenso intemperismo e lixiviação. Tem elevada capacidade de fixação de fósforo (Fernandes & Muraoka, 2002) e todos esse fatores tornam o solo do Cerrado ácido, pobre em nutrientes e com altos teores de Fe e Al. Na planta, o alumínio causa a inibição do seu crescimento, provavelmente por impedir a absorção de minerais como cálcio, magnésio e fósforo, ou por inibir o crescimento da raiz (Meharg, 1994). No entanto, algumas espécies do cerrado são acumuladoras de alumínio e possuem mecanismos de adaptação eficientes na utilização dos nutrientes (Haridasan, 1982; Haridasan et al. 1987). Tal adaptação dessas plantas, proporcionam para o bioma cerrado, grande biodiversidade e inúmeras espécies de interesse econômico como plantas medicinais e frutíferas que geralmente são utilizadas pela população local como fonte de alimento e no tratamento de doenças (Alves et al., 2000).

Uma dessas espécies é o murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss), árvore frutífera de pequeno porte, que tem grande importância na produção de alimentos, lenha e na medicina popular. Segundo Almeida et al. (1998), os frutos são consumidos *in natura* ou processados, e sua casca serve como antitérmico. Encontram nos frutos grande fonte de energia e nutrientes (Silva et al., 2008).

A produção de fruteiras no cerrado ainda é limitada pela carência de conhecimentos sobre diversos segmentos dos sistemas de produção das culturas, assim

o cultivo *in vitro* se torna uma alternativa para rápida multiplicação, quando comparado aos métodos tradicionais de propagação (Erig & Schuch, 2002; Lédo et al., 2007).

Fatores como o ajuste do pH do meio e a composição dos nutrientes, são fundamentais no cultivo de plantas. O pH influencia a disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e o grau de solidificação do ágar (Pasqual et al., 2002). Valores de pH entre 5,0 e 6,5 proporcionam os melhores resultados na maioria das culturas *in vitro*, (Pierik, 1987). Se os níveis de pH forem inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, poderá ocorrer paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (Murashige, 1974). Durante o crescimento da planta, o pH do meio de cultura se altera à medida que diferentes íons são absorvidos e os produtos metabólicos são excretados para o meio. A autoclavagem e a estocagem também são fatores que acidificam o meio de cultivo (SKIRVIN et al., 1986).

Assim a acidez ou basicidade do meio, quando bem ajustados podem promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante (Diniz et al., 1999; Kanashiro et al., 2007; Nicoloso et al., 2008).

Os nutrientes, suplementados no meio de cultivo também são essenciais no processo *in vitro* (Kanashiro et al., 2009). Os macronutrientes como o nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, e enxofre são utilizados em todos os tipos de culturas, mas a concentração ideal depende de cada espécie (Rout et al., 2000).

A elevada variabilidade de comportamento das espécies *in vitro* requer a adaptação de condições de cultivo para cada espécie em específico. Assim, para o sucesso da micropropagação é necessário que a composição mineral do meio seja adequada, para manutenção do ótimo crescimento das plantas. Os mecanismos de absorção mineral das plântulas *in vitro* podem ser diferentes daqueles utilizados pelas plantas em condições *in vivo*, pelo fato de crescerem em condições especiais de fornecimento de nutrientes (Kanashiro et al., 2007).

Para avaliar as exigências nutricionais de *B. cydoniifolia* A. Juss., uma espécie adaptada ao cerrado, objetivou-se avaliar o pH e a composição do meio de cultivo, visando sua melhor adaptação *in vitro*.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde. A exsiccata do material vegetal está

depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás *Campus* Jataí, sob o número 5646.

Utilizou-se como fonte de explante, plântulas obtidas assepticamente, com 30 dias de cultivo *in vitro*, provenientes de embriões zigóticos. As folhas cotiledonares e a radícula das plântulas foram excisadas obtendo segmentos nodais de aproximadamente 1 cm.

5.4.1 Ensaio I: Ajuste do pH no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios (25 x 150 mm) contendo 20 mL do meio de cultivo WPM (Lloyd & Mccown, 1980), com a metade das concentrações de sais, acrescidos com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 3,5 g L⁻¹ de ágar (Marca: Dinâmica). O meio foi ajustado com diferentes valores iniciais de pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5) antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os segmentos nodais inoculados foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25±2 °C, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m⁻²s⁻¹, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Após 30 dias de cultivo, avaliou o comprimento médio da parte aérea (cm), o número médio de folhas e raízes por explante e o comprimento médio de raízes (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 20 repetições, cada uma constituída por um tubo de ensaio, totalizando em 120 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade e as médias foram analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2011).

5.4.2 Ensaio II: Uso de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios (25 x 150 mm) contendo 20 mL do meio de cultivo WPM a 50%, com modificações nas concentrações do KH₂PO₄ (0,0; 1,7; 17 e 170 mg L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (0,0; 3,7; 37 e 370 mg L⁻¹), acrescidos com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 3,5 g L⁻¹ de ágar (Marca: Dinâmica). O pH foi ajustado para valor 5,0, conforme o melhor resultado do ensaio anterior, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os segmentos

nodais inoculados foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Após 60 dias de cultivo, avaliou o comprimento da parte aérea, número de gemas, número de folhas expandidas, comprimento e número de raízes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos para cada nutriente, 20 repetições, cada uma constituída por um tudo de ensaio, totalizando em 160 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade e as médias foram analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Ensaio I: Ajuste do pH no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss

Observou que para as características de formação de calos e número de folhas expandidas, valores mais baixos de pH foram os mais adequados para o cultivo *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss e os valores mais altos de pH do meio, como 6,0 e 6,5 foram os que resultaram nos menores valores para as características avaliadas (Figura 1).

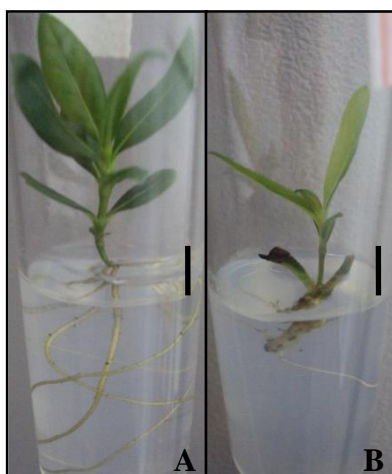


Figura 1. Plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss., aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes valores de pH do meio: (A) meio de cultivo com pH 5,0; (B) meio de cultivo com pH 6,5. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

O maior valor para o crescimento da parte aérea (2,77 cm) ocorreu quando se utilizou o valor de pH 4,88 (ponto de máxima), a partir desse ponto houve um decréscimo no crescimento, com o aumento do pH (Figura 2 A).

Para o número de folhas por explante, o maior valor obtido também foi com a utilização do pH 4,88. Ocorrendo a diminuição do número de folhas com o aumento do pH, chegando aos menores valores quando se utilizou pH 6,0 e 6,5 (Figura 2 B). Em relação ao número médio de raízes, obteve-se uma correlação negativa, ou seja, observou-se que quanto menor o pH, maior o número de raízes, assim a medida que o valor do pH aumentou, o número de raízes diminuíram (Figura 2 C). Já para o comprimento médio de raízes, o pH ótimo foi de 4,92, a partir do qual ocorreu redução do comprimento das raízes com o aumento do pH (Figura 2 D).

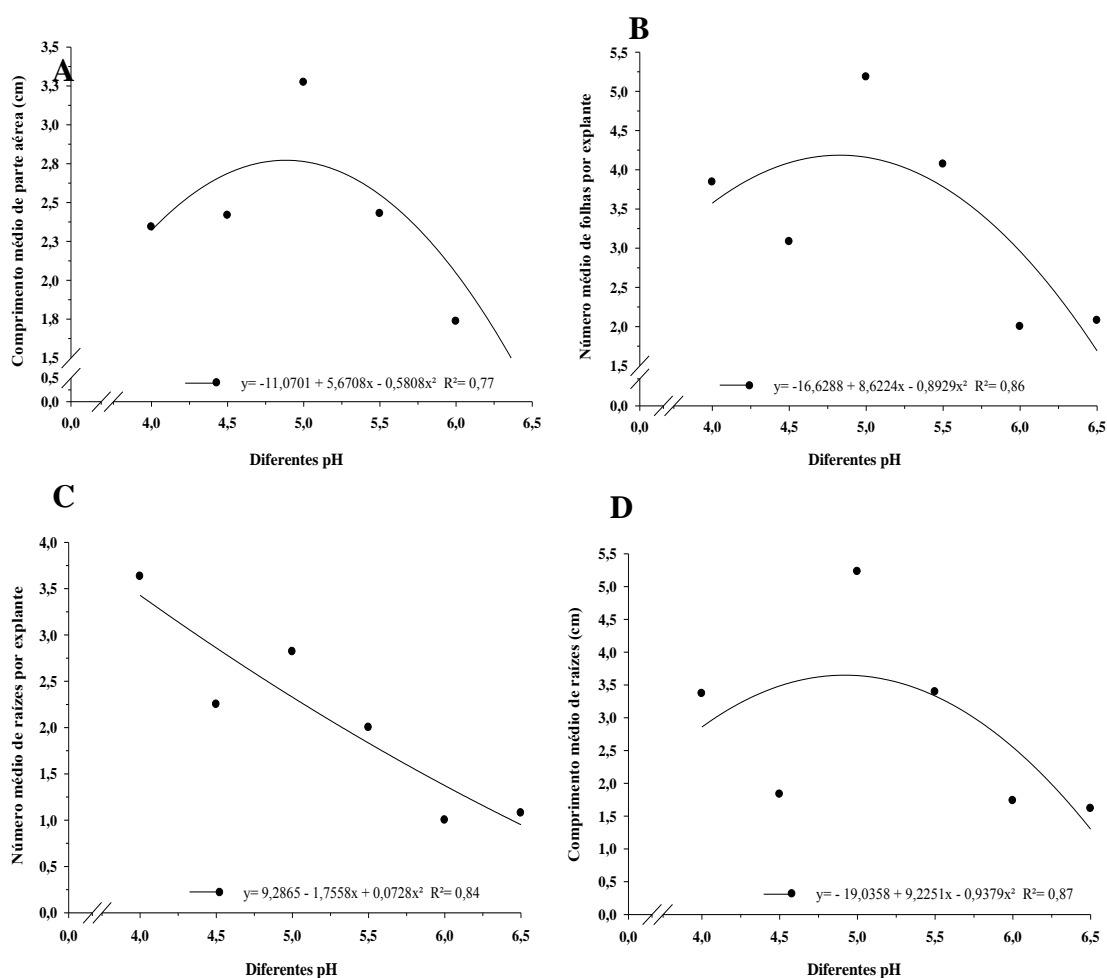


Figura 2. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes valores de pHs, avaliadas aos 30 dias: (A) comprimento médio da parte aérea (cm); (B) número médio de folhas por explante; (C) número médio de raízes por explante; (D) comprimento médio de raízes (cm). Rio Verde-GO, 2012.

Os resultados indicam que para o cultivo *in vitro* de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.), valor de pH inicial menor do que geralmente é utilizado (5,7-5,8), é mais adequado. Tendo em vista que o murici é bem adaptado para ambientes com solos mais ácidos.

Segundo Islam et al. (1980), baixos valores do pH prejudicam o crescimento das plantas pelo excesso de hidrogênio como efeito direto e indireto pela mudança na solubilidade de vários elementos minerais importantes. Assim, a planta deve possuir estratégias para conseguir viver em lugares ácidos.

Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por Gomes & Shepherd (2000), que ao testarem diferentes valores de pH do meio de cultivo, para uma espécie do cerrado a *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae), observaram que o crescimento foi favorável nos meios com os menores valores iniciais de pH. Resultados diferentes a estes, indicam que valores de pH do meio de cultivo próximos a 6,0, são ideais para o crescimento da ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) cultivada *in vitro* (Nicoloso et al., 2008).

Assim, verificou-se que o valor de pH 5,0 foi o mais adequado para o cultivo *in vitro* de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.).

5.5.2 Ensaio II: Uso de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) no crescimento de *B. cydoniifolia* A. Juss.

A utilização de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), somente teve significância para o comprimento médio da parte aérea. O modelo de regressão quadrática teve melhor ajuste. Observou-se que para esta característica, o menor valor obtido foi 3,04 cm, na ausência de KH₂PO₄, e que, com o aumento da concentração deste nutriente houve uma tendência ao aumento do comprimento médio da parte aérea (5,5 cm), com o ponto de máxima (97,75 mg L⁻¹) para a utilização de KH₂PO₄ (Figura 3 A). As diferentes concentrações de KH₂PO₄, utilizadas neste ensaio, não influenciaram nas características de número de gemas, de folhas, comprimento e número de raízes.

O sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), não exerceu significância para o comprimento médio da parte aérea. Para o número de folhas expandidas por explante, na ausência e na concentração de 3,7 mg L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, obtiveram-se os valores de 7,5 e 8,0, respectivamente. Ao aumentar a concentração para 37 mg L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, o número de folhas também aumentou (9,5), porém ao utilizar

370 mg L⁻¹, o número de folhas diminuiu, atingindo o menor valor (6,2). O ponto de máxima para a concentração de MgSO₄.7H₂O foi de 142,25 mg L⁻¹ (Figura 3 B). Para o número de gemas por explante, obteve-se o valor de 3,6 na ausência de MgSO₄.7H₂O e a medida que houve aumento da concentração, ocorreu aumento do número de gemas por explante, chegando a 4,2 gemas com a utilização de 37 mg L⁻¹. Entretanto, com a utilização de 370 mg L⁻¹, o número de gemas diminuiu, atingindo o menor valor (3,2). O ponto de máxima para este nutriente foi de 164 mg L⁻¹ (Figura 3 C). Já para o número médio de raízes formadas por explante, o menor valor (1,55), foi obtido ao utilizar 3,7 mg L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e o maior valor com 37 mg L⁻¹, com tendência à diminuição do número de raiz (3,20), com a concentração máxima de 370 mg L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. O ponto de máxima para esta característica foi de 192,1 mg L⁻¹ para a utilização de MgSO₄.7H₂O (Figura 3 D).

No meio WPM, utilizou-se a concentração de 17 mg L⁻¹ para o KH₂PO₄ e 37 mg L⁻¹ para MgSO₄.7H₂O, neste estudo, observou-se que o aumento da concentração de KH₂PO₄ até 170 mg L⁻¹ e manter 37 mg L⁻¹ para MgSO₄.7H₂O, promoveu benefício para as plântulas de *B. cydoniifolia* A. Juss *in vitro*. Observou-se também que para algumas características a ausência destes nutrientes não foi prejudicial. Estes resultados indicaram que esta espécie, tem eficiência na utilização desses nutrientes presentes no meio de cultivo e que a espécie em estudo tem estratégias na utilização desses nutrientes quando está na ausência deles.

Verificou-se que em todos os tratamentos houve regeneração dos segmentos nodais em plântulas, que eram bem formadas, sem oxidações ou com formações de calos. A coloração verde das folhas era a mesma tanto na ausência, como nas diferentes concentrações dos nutrientes. Provavelmente, essa espécie tem adaptações para crescer em ambientes com ausências dos nutrientes estudados.

Entretando, nos estudos de Batista et al. (2003), observou-se que plantas de graviola (*Annona muricata* L.) com sintomas de deficiência de fósforo e potássio, tinham coloração verde-amarelada das folhas, sendo que em plantas com deficiência de fósforo verificaram ainda o estreitamento foliar. Entretanto, estudos realizados por Gomes & Shepherd (2000), mostraram que a *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae), espécie típica do cerrado, cultivada em meio MS, obteve crescimento favorável em meios com baixa concentração de KH₂PO₄ e MgSO₄.7H₂O. Já Zaidan

(1999), obteve melhores respostas quando utilizou de 15 a 20 mM de K, para os cultivares de plântulas de bananeira (*Musa* sp., AAA e AAB) *in vitro*.

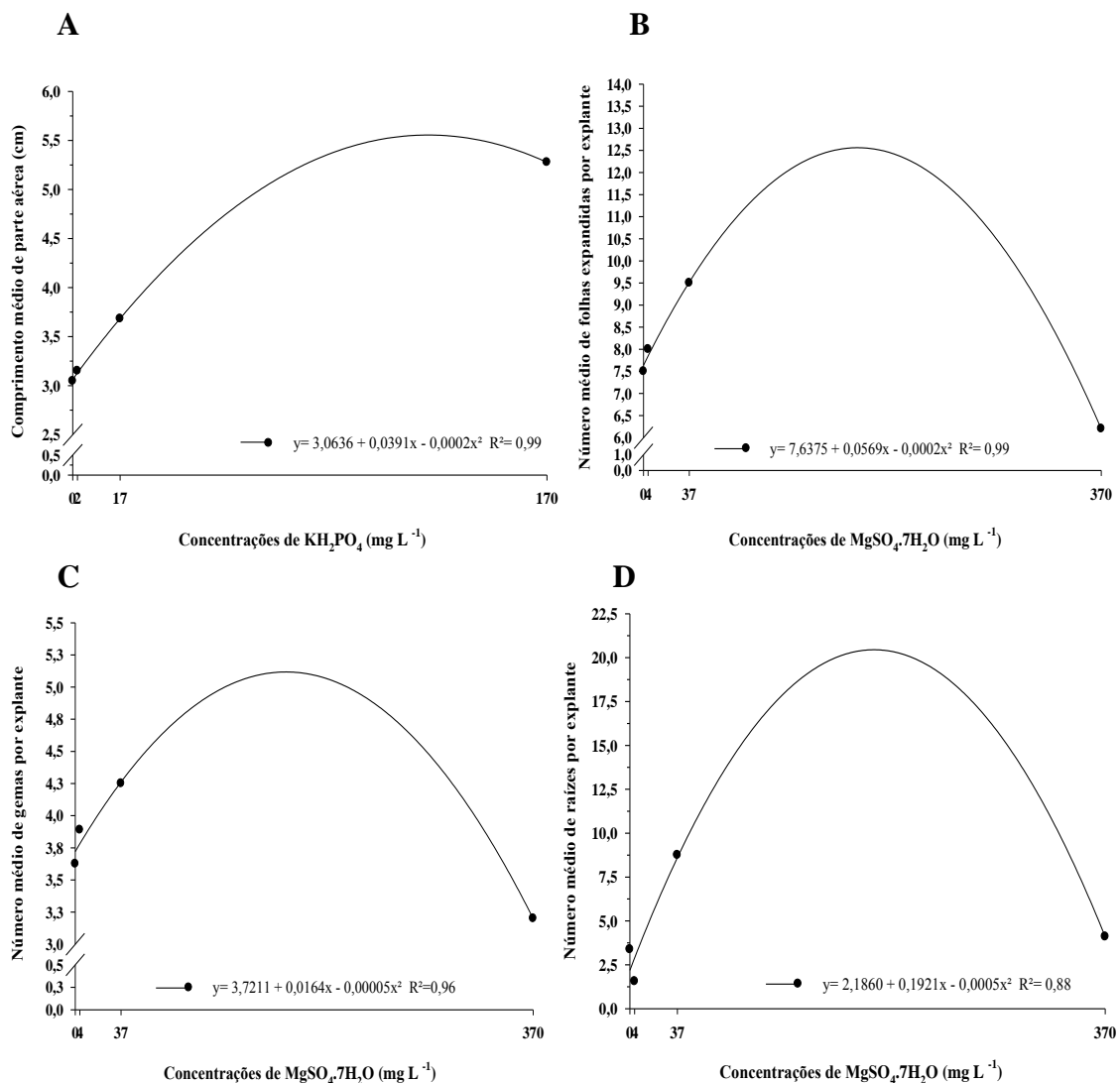


Figura 3. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes concentrações de KH_2PO_4 (mg L^{-1}) avaliadas aos 60 dias: (A) comprimento médio de parte aérea (cm); e em diferentes concentrações de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg L^{-1}) avaliadas aos 60 dias (B) número médio de folhas expandidas por explante; (C) número médio de gemas por explante; (D) número médio de raízes por explante. Rio Verde-GO, 2012.

Segundo Marschner (1997), as combinações entre os íons estão envolvidas com a absorção e utilização pela planta, como a competição, o sinergismo e a relação cátion-ânion. No preparo de soluções nutritivas artificiais, é importante, não somente os íons requeridos, mas também a razão individual entre eles, ou seja, o balanço iônico (Mohr & Schopfer, 1995).

Em geral, plantas de ambientes oligotróficos como o cerrado, acumulam menos nutrientes, refletindo, o estado nutricional dos solos em que se encontram (CUZZUOL et al., 2005). Assim, observou-se que a espécie de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.), cresceu tanto no meio de cultivo com o pH ácido quanto na ausência de nutrientes, portanto, a espécie em estudo, pode se adaptar para sobreviver em solos ácidos e com pouca fertilidade.

5.6 CONCLUSÕES

- O uso de pH 5,0 foi adequado para o cultivo *in vitro* de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.)
- Dentre as concentrações testadas, é viável a utilização de KH_2PO_4 a 170 mg L^{-1} e e manter 37 mg L^{-1} para $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, no cultivo *in vitro* desta espécie.

5.7 AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a FAPEG, a CAPES, programa PIBIC, IFGoiano *Campus* Rio Verde, pelo auxílio financeiro e ao Centro de Treinamento da EMATER pelo fornecimento do material vegetal.

5.8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. EMBRAPA-CPAC. Planaltina, DF, 1998. 464p.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SAMÂNIA, E. F.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367-373, 2000.
- BATISTA, M. M. F.; VIÉGAS, I. de J. M.; FRAZÃO, D. A. C.; THOMAZ, M. A. A.; SILVA, R. de C. L. da. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em gravioleiras (*Annona muricata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.315-318, 2003.
- CUZZUOL, G. R. F.; CARVALHO, M. A. M.; ZAIDAN, L. B. P.; FURLAN, P. R. Soluções nutritivas para cultivo e produção de frutanos em plantas de Vernonia herbácea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 911-917, 2005.
- DINIZ, J. D. N.; GONÇALVES, A. N.; HERNANDEZ, F. F. F.; TORRES, A. C. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1201-1209, 1999.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: Efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.293-295, 2002.

FERNANDES, C.; MURAOKA, T. Absorção de fósforo por híbridos de milho cultivados em solo de Cerrado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p. 781-787, 2002.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GOMES, M. A. N.; SHEPHERD, S. L. K. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, n.2, p.153-159, 2000.

HARIDASAN, M. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v.65, n.2, p.265-273, 1982.

HARIDASAN, M.; HILL, P.G.; RUSSELL, D. Semi quantitative estimates of Al and other cations in the leaf tissues of some Al-accumulating species using electron probe microanalysis. **Plant and Soil**, The Hague, v.104, p.99-102, 1987.

ISLAM, A.K.M.S.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J. PH optima for crop growth. **Plant Soil**, The Hague, v.54, p.339-357, 1980.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇALVES, A. N.; DEMÉTRIO, V. A.; JOCYS, T.; TAVARES, A. R. Effect of calcium on the *in vitro* growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith plantlets. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v.32, p.867-877, 2009.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. de C. S.; GONÇALVES A. N.; DIAS, C. T. dos S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Backer) L. B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 50-66, 2007.

LÉDO, A da S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JÚNIOR, 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. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MARSCHNER, H. **Ion uptake mechanisms of individual cells and roots: short-distance transport.** In **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 2 ed., 1997. p.6-78.

MEHARG, A.A. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.17, p.989-993, 1994.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. Metabolism of water and inorganic ions. **Plant physiology**. Springer-Verlag, Berlin, p.259-267, 1995.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

MYERS, N.; MITTERMEIER, C.; MITTERMEIER, G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v.403, p.853-858, 2000.

NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E.; CASTRO, G. y. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n. 7, p. 2059-2062, 2008.

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

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Martinus Nyjhoff Dordrecht, Holanda, 1987. 344p.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, New York, v.18, p. 91-120, 2000.

SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.5, p.292-294, 1986.

SILVA, M. R.; LACERDA, K. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. O. Caracterização química de frutos nativos do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1790-1793, 2008.

SOUZA, D.M.G. & LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2.ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 416p.

ZAIDAN, H. A.; OLIVEIRA, E. T.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. Comportamento Fisiológico *in vitro* de bananeira (*Musa* sp., AAA e AAB) cvs. Nanica e prata anã: influência de diferentes níveis de potássio. **Scientia Agricola**, v.56, n.2, Piracicaba, 1999.

6 CAPÍTULO V: MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE MURICI (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.): USO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E ESTÍMULO AO FOTOAUTOTROFISMO

6.1 RESUMO

A micropropagação é uma alternativa para o cultivo *in vitro* de murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.), uma frutífera do cerrado brasileiro que tem elevado potencial agrônômico, no entanto tem limitações quanto a propagação. Desse modo, objetivou-se avaliar a utilização de reguladores de crescimento e estimular a fotoautotrofia, testando diferentes tipos de vedações e o uso de sacarose no crescimento *in vitro* de murici. No ensaio I, o meio de cultivo foi suplementado com BAP nas concentrações de 0,0; 11,1; 22,2 e 44,4 μM e com ANA nas concentrações de 0,0; 6,71; 13,43 e 26,85 μM . Para o ensaio II, foi adicionado ao meio de cultivo 4,9 μM de AIB, acrescidos ou não de sacarose com três tipos de vedações, como tampa plástica, vedafilme e tampão de algodão. Após 60 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de calo, o número de folhas, comprimento da parte aérea, o comprimento e número de raízes. Verificou-se que a concentração de 11,1 μM de BAP e 13,43 μM de ANA foram os mais adequados. Os tipos de vedações não influenciaram no crescimento de *B. cydoniifolia* A. Juss., porém o meio acrescido com sacarose, foi eficiente para o crescimento da espécie em estudo.

PALAVRAS-CHAVE: auxinas, citocininas, enraizamento, frutífera do Cerrado.

6.2 ABSTRACT

Micropropagation is an alternative to *in vitro* culture of murici (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.), a Brazilian cerrado fruit that has high agronomic potential, but has limits on the spread. Therefore it was aimed to evaluate the use of growth regulators and stimulate photoautotrophic, testing different types of seals and the use of sucrose of *in vitro* growth of murici. In assay I, the culture medium was supplemented with BAP at concentrations of 0.0, 11.1, 22.2 and 44.4 μM and NAA at concentrations of 0.0, 6.71, 13.43, 26.85 and 43 μM . For assay II, was added to the culture medium 4.9 μM of IBA plus to sucrose with three types of seals, such as plastic lid, plastic film and cotton plug. After 60 days of culture, there were evaluated the percentage of callus, leaf number, shoot length, the length and number of root. It was found that the concentration of 11.1

μM BAP and $13.43 \mu\text{M}$ NAA were best suited. The types of seals did not influence the growth of *B. cydoniifolia* A. Juss. but the medium plus sucrose was effective for the growth of the species under study

KEY WORDS: auxins, cytokinins, root, fruit of the cerrado.

6.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae), tem uma grande variedade de espécies que são conhecidas como murici. O murici é uma frutífera do cerrado brasileiro, que tem elevado potencial agrônomo, pelo fornecimento de frutos para o consumo *in natura* e pela produção de fármaco (Carvalho & Nascimento, 2008; Isaac et al., 2008, Nogueira et al., 2004;).

Da mesma forma que as demais espécies nativas, a *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss., tem limitações quanto a propagação, que é agravada pela irregularidade no seu processo de germinação que normalmente é baixa, lenta e com acentuada desuniformidade, decorrentes do espesso endocarpo que dificulta o crescimento do embrião inviabilizando a produção de mudas (Carvalho & Nascimento, 2008; Nogueira et al., 2008; Sautu et al., 2007).

Como via alternativa de propagação assexuada, a micropropagação via organogênese direta estabelece a diferenciação de brotações e raízes durante o crescimento do vegetal. Para a indução dos processos de desdiferenciação e rediferenciação responsáveis pela formação de tecidos e órgãos, além da escolha do explante mais adequado, é necessário o uso de regulador de crescimento capaz de estimular a formação de parte aérea e raízes (Kielse et al., 2009). Assim, as multiplicações de clones com a qualidade desejada, são obtidas com explantes como os segmentos nodais, que são mais apropriados para o estabelecimento *in vitro* quando comparados com explantes reprodutivos, como as sementes (Assis et al., 2011).

Frequentemente, as brotações são induzidas em meio de cultivo adicionados de citocininas e subsequentemente, estas brotações são enraizadas em um meio contendo auxina (Nicioli et al., 2008). Assim para quebrar a dominância apical dos brotos, e aumentar a taxa de multiplicação são utilizadas as citocininas, já as auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações axilares, podem auxiliar o crescimento do cultivo *in vitro*, induzindo a formação de raízes (Kielse et al., 2009, Grimaldi et al., 2008).

Fatores como a concentração dos sais e dos reguladores de crescimento nos meios de cultivo, bem como a temperatura e fotoperíodo são os que mais diferem entre as espécies micropropagadas, porém, de igual importância se destacam a utilização ou não de fonte de carbono e o uso de tampas empregadas no processo de fechamento dos frascos, estes fatores também podem influenciar significativamente o crescimento *in vitro* (Fuente et al., 2005; Rodrigues Melo & Alonfa, 2006; Skrebsky et al., 2006; Santana et al., 2008).

Em virtude do processo em que se desenvolvem plântulas ou brotações *in vitro* são anatomicamente e fisiologicamente, diferentes de mudas produzidas *in vivo*. Isso se deve ao processo em que elas se desenvolvem. Habitualmente, as culturas são heterotróficas, dessa forma, as mudas produzidas heterotroficamente não operam eficientemente a absorção de luz, água e nutrientes (Scaranari, Leal, Pellegrino, 2008; Dosseau et al., 2008).

Segundo Santana (2008), a melhora nas trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco de cultura e o meio externo conduz a um efeito positivo sobre o crescimento e sobre o estímulo ao fotoautotrofismo *in vitro*.

Os tipos de vedações é um dos fatores que influenciam no microambiente dentro do recipiente de cultivo, interferindo nas trocas gasosas entre o interior do frasco e o ar atmosférico (Santana et al., 2008).

Desse modo, objetivou-se avaliar a utilização de reguladores de crescimento e estimular a fotoautotrofia, testando diferentes tipos de vedações e o uso de sacarose no crescimento *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde. A exsicata do material vegetal está depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás *Campus* Jataí, sob o número 5646.

Obtiveram-se os explantes primários, utilizando plântulas preestabelecidas *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss., que estavam inoculadas em meio WPM 50% sem regulador de crescimento com 60 dias de cultivo *in vitro*.

Segmentos nodais foram excisados contendo um par de gemas laterais com comprimento médio de 1,0 cm.

6.4.1 Ensaios I e II: Uso de BAP e ANA na multiplicação de *B. cydoniifolia* A. Juss., a partir de segmentos nodais

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaios (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), com 50% das concentrações dos sais. O meio de cultivo foi suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,0; 11,1; 22,2 e 44,4 μM e ácido naftaleno acético (ANA) nas concentrações de 0,0; 6,71; 13,43 e 26,85 μM . Para a solidificação do meio utilizou-se 3,5 g L^{-1} ágar (Marca: Dinâmica) e o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,3$ antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os explantes inoculados, foram vedados com tampa plástica (polipropileno) e mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Aos 60 dias de cultivo, avaliou-se, a porcentagem de calo, o número de brotos laterais, o número médio de folhas expandidas, o comprimento da parte aérea e a porcentagem de enraizamento.

Para cada ensaio, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo 4 tratamentos e 20 repetições, constituída cada uma por um tubo de ensaio, totalizando 80 unidades experimentais para cada regulador de crescimento. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância com aplicação do teste de F a 5% de probabilidade e as médias foram analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2011).

6.4.2 Ensaio III: Estímulo do comportamento fotoautotrófico: crescimento da parte aérea e raiz.

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaios (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio WPM com 50% das concentrações dos sais e suplementado com 4,9 μM de ácido indolbutírico (AIB), acrescidos ou não com 30 g L^{-1} de sacarose. Para a solidificação do meio utilizou-se 3,5 g L^{-1} ágar (Marca: Dinâmica) e o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,3$ antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram inoculados e fechados com três tipos de vedações, com tampa plástica (polipropileno), vedafilme (película de PVC) ou tampão de algodão. Em seguida, foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$,

umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Aos 60 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de calos, o número de folhas expandidas por plântula, o número de raízes, o comprimento médio da parte aérea e do sistema radicular.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x3 (concentração de sacarose x tipos de vedação) e cada tratamento continha 20 repetições, cada uma constituída por um tudo de ensaio, totalizando 120 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Ensaio I: Uso de BAP na multiplicação de *B. cydoniifolia* A. Juss., a partir de segmentos nodais.

A utilização de BAP no meio de cultivo foi significativo e o modelo de regressão quadrático teve melhor ajuste. Observou-se que a utilização de BAP no meio de cultivo induziu a formação de calos presentes na base de todos os explantes inoculados (Figura 1 A). Quanto ao número de folhas ocorreu um aumento nos valores com adição de BAP até 22,2 μM a partir dessa concentração, os valores diminuíram (Figura 1 B). Só houve a formação de raízes no tratamento em que não se utilizou regulador de crescimento, obteve-se média de 16,66% (Figura 1 C). Com relação ao número médio de brotos e comprimento médio da parte aérea, não houve significância nas concentrações testadas. Os valores de ponto de máxima em relação a utilização da concentração de BAP foram: para a formação de calos 7 μM , para o número de folhas 4,10 μM e para a porcentagem de enraizamento 6,75 μM .

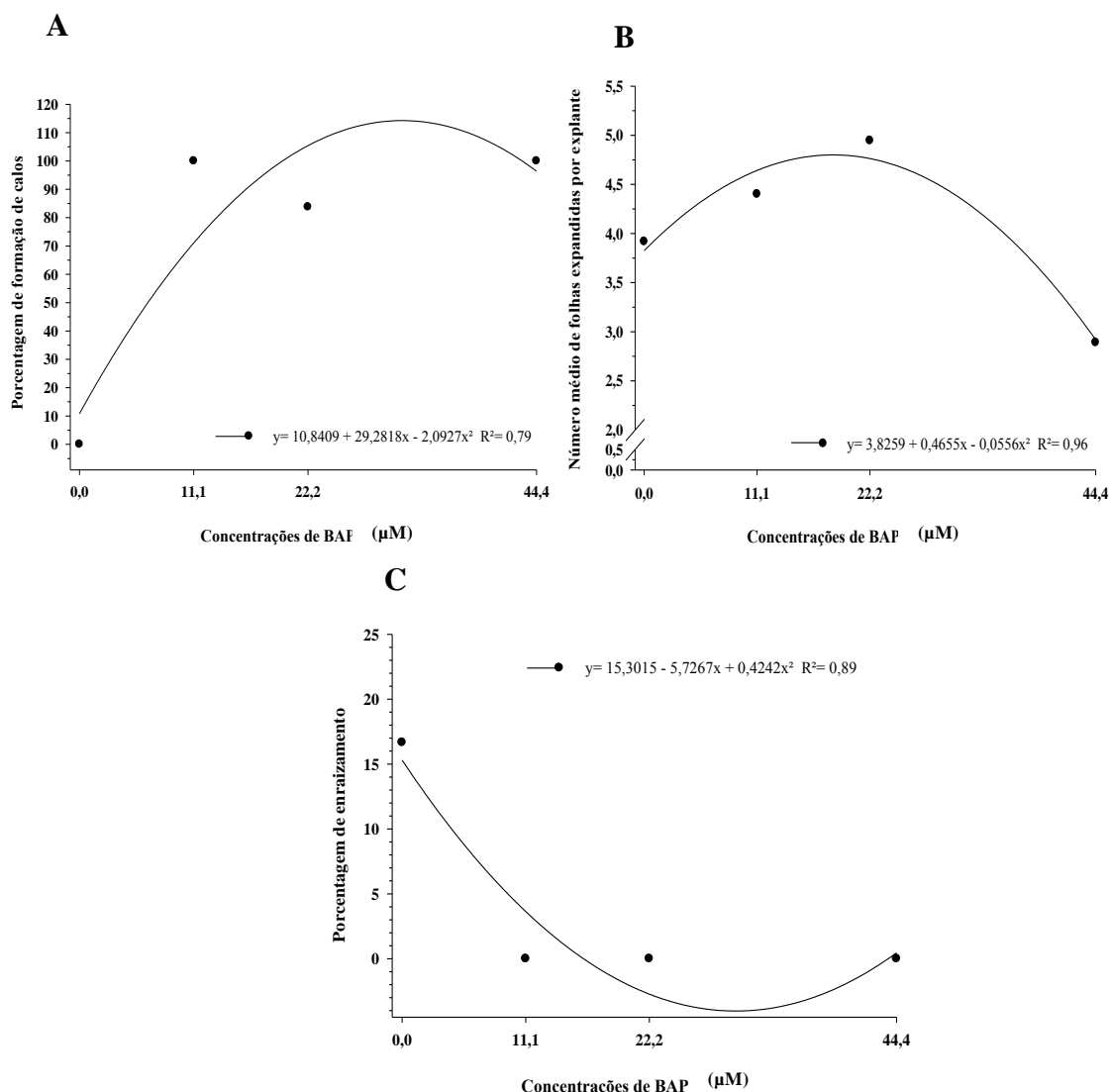


Figura 1. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes concentrações de BAP (μM), avaliadas aos 60 dias: (A) porcentagem de formação de calo; (B) número de folhas expandidas por explante; (C) porcentagem de enraizamento; em relação a concentração de BAP (μM). Rio Verde-GO, 2012.

Visualmente, notaram que em todos os tratamentos houve a formação de calos na base do explante (Figura 2), exceto o tratamento, sem a adição de regulador de crescimento (controle) (Figura 2 A). Utilizando concentrações de 11,1 μM , houve formação de calos na base, entretanto, teve maior crescimento da parte aérea (Figura 2 B). Verificou-se também que, a medida em que se acrescentou BAP no meio de cultivo (de 22,2 a 44,4 μM), houve uma modificação na coloração das folhas dos explantes, que ficaram avermelhadas (Figura 2 C-E).

A formação de calos foi mais intensa quando se utilizou a concentração de 44,4 μM (Figura 2 E).

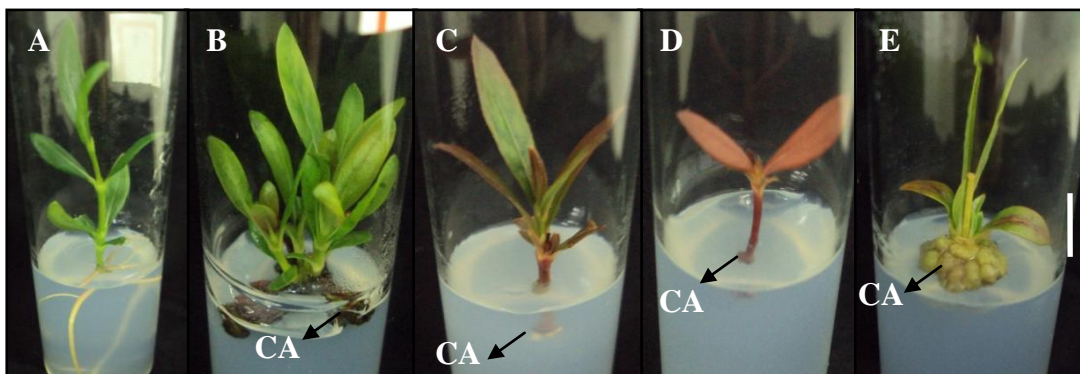


Figura 2. Crescimento *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., provenientes de segmentos nodais: (A) plântula no meio de cultivo sem regulador de crescimento; (B) plântula com várias brotações no meio de cultivo acrescido com 11,1 μM de BAP; (C) plântula com as extremidades das folhas avermelhadas sem a formação de raiz, em meio de cultivo contendo 22,2 μM de BAP; (D) plântula com coloração avermelhada sem a formação de raiz, em meio de cultivo acrescido com 44,4 μM L de BAP; (E) plântula com formação de calos, em meio de cultivo acrescido com 44,4 μM L de BAP; CA: calo. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

Desta forma, a utilização de 22,2 μM de BAP pode ser utilizada em *B. cydoniifolia* A. Juss., promoveu os melhores resultados para formação de folhas expandidas e de brotos e menor porcentagem de formação de calos, no entanto, como a adição de BAP não influenciou o processo de indução de número de brotos, recomenda-se o uso de 11,1 μM de BAP por manter os explantes morfológicamente mais próximos da planta matriz.

Segundo Nogueira (2003), as concentrações de BAP acima de 17,7 μM não foram eficientes para a indução de brotos axilares em segmentos nodais de murici pequeno (*B. intermedia* A. Juss.). Também nos estudos de Soares et al. (2007), ao testar as concentrações de 4,44 e 8,88 μM de BAP, observaram brotações mais desenvolvidas e acompanhadas da formação de calos na base dos explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Já a utilização de 8,88 μM de BAP promoveu maior número de brotos de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Brazos, quando testados em diferentes meios de cultivo e concentrações de BAP (VILLA et al., 2010). Resultados diferentes a estes, foram obtidos por Souza et al. (2008) que indicam baixas concentrações de BAP, para a multiplicação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.).

6.5.2 Ensaio II: Uso de ANA na multiplicação de *B. cydoniifolia* A. Juss., a partir de segmentos nodais.

Em relação ao ANA, observa-se que quanto maior a concentração do regulador de crescimento, maiores são os valores das características, exceto para o número médio de brotos. De maneira geral, altas concentrações (26,85 μM) induziram respostas em todas as características avaliadas, no entanto, nestas brotações houve a formação de calos na base do explante. O ponto máximo para a utilização de ANA foi de 1,17 μM na formação de calos, 3,64 μM no número de brotos, 1,01 μM no número de folhas expandidas, 0,66 μM no comprimento da parte aeres e 10,68 μM no enraizamento. Visualmente, detectou-se que a parte aérea era bem formada com folhas expandidas, ficando comprometida somente a formação de brotos por explantes (Figura 3).

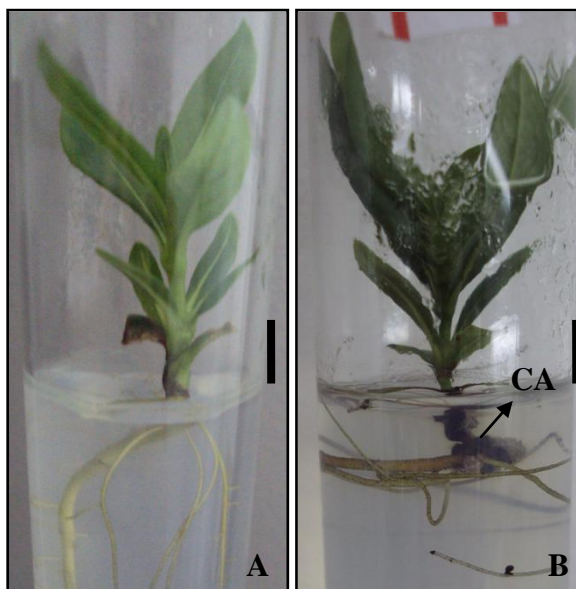


Figura 3. Crescimento *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., provenientes de segmentos nodais: (A) plântula, acrescido com 13,43 μM de ANA; (B) plântula, acrescido com 26,85 μM de ANA; CA: calo. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

Segundo Fett Neto et al. (1992) e Blakesley et al., (1991), quando a concentração de auxina no meio é excessiva, ocorre a formação de calos na base do explante, comprometendo o crescimento da parte aérea e a rizogênese. Os autores ainda relatam que a toxidez por auxina durante o enraizamento pode se manifestar apenas na fase de alongamento das raízes e é por isso que geralmente se recomenda trabalhar com dois tipos de meio de cultivo. Primeiramente com meio de cultivo contendo auxina, o que favorecerá a indução, e posteriormente transferir o explante para meio sem auxina, estimulando a rizogênese e o crescimento das raízes. Assim sendo, considerou-se tóxico ANA a 26,85 μM , todavia, obtiveram também resultados positivos com a utilização de

13,43 μM de ANA sendo esta a concentração indicada, por não induzir a formação de calos na base do explante (Figura 4 A). As concentrações de 13,43 e 26,85 μM de ANA, proporcionaram as maiores porcentagens de enraizamento (56,25 e 70,16 %) respectivamente (Figura 4 E).

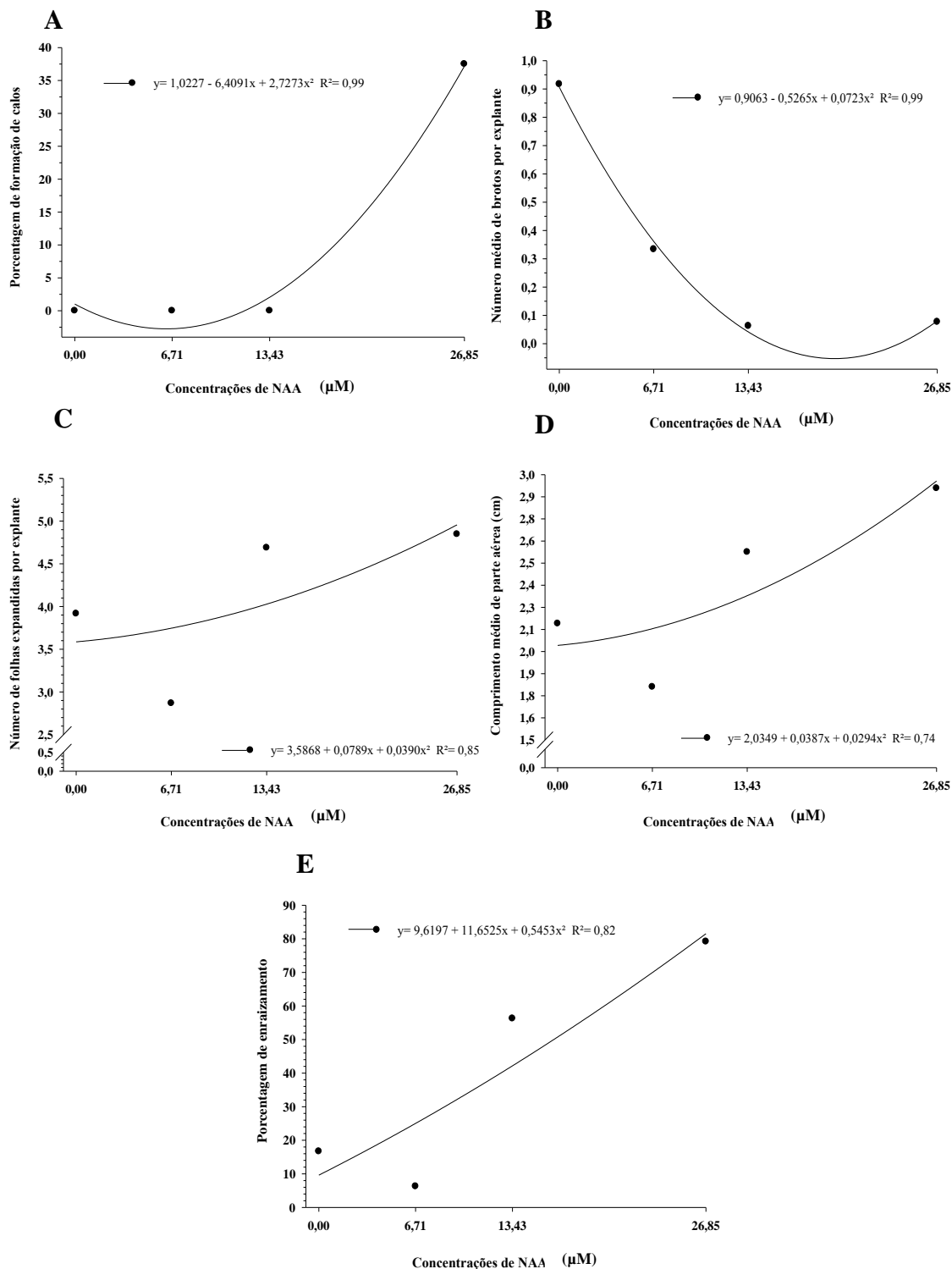


Figura 4. Cultivo *in vitro* de plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss., em diferentes concentrações de ANA (μM), avaliadas aos 60 dias: (A) porcentagem de formação de calo; (B) número médio de brotos por explantes; (C) número de folhas expandidas por explante; (D) comprimento médio da parte aérea (cm); (E) porcentagem de enraizamento. Rio Verde-GO, 2012.

Resultados semelhantes foram obtidos no enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC, quando se utilizou ANA na concentração de 10 μM no meio de cultivo, promovendo a maior percentagem de enraizamento (Erig & Schuch, 2004). Com resultados diferentes a estes, Soares et al. (2007), ao testar várias concentrações de ANA, não obteve a formação de raízes em brotações de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

6.5.3 Ensaio III: Estímulo do comportamento fotoautotrófico: crescimento da parte aérea e raiz.

Verificou-se que só houve interação do efeito dos fatores sacarose x tipos de vedações para a porcentagem da formação de calo. Sendo que as menores porcentagens de calo (15 e 10 % respectivamente), obteve quando utilizou vedafilme e algodão como vedação na ausência de sacarose (Tabela 1).

Para o número de folhas por plântula, na presença de sacarose quando se utilizou tampão de algodão obteve o maior valor (1,84). Porém não houve diferença, quando se comparou os tipos de vedações tanto na ausência como na presença de sacarose (Tabela 1).

Já para o número de raiz por plântula e o comprimento médio de raízes, obtiveram os maiores resultados na presença de sacarose no meio de cultivo, independente do tipo de vedação utilizado. Já entre os tipos de vedações não houve diferença tanto na ausência quanto na presença de sacarose (Tabela 1).

Observou-se visualmente que as plantas de murici, estavam bem formadas, sem oxidações ou formação de calos. A presença de sacarose no meio de cultivo otimizou o crescimento de murici e foi fundamental para a formação do sistema radicular (Figura 5). As plântulas crescidas em meio sem sacarose tinham sinais de deficiência que eram perceptíveis pela coloração, que era verde mais claro ao habitual. Observou-se também que o tamanho das plântulas eram reduzidos, no meio que não havia sacarose. Segundo Fuentes et al. (2007), o decréscimo na concentração de sacarose no meio de cultivo pode melhorar a fotossíntese das plantas, mas também pode afetar negativamente o crescimento sob as condições padrões utilizadas nas salas de crescimento.

Tabela 1. Porcentagem da formação de calo, número de folhas por plântula, comprimento médio da parte aérea (cm), número de raiz por plântula e comprimento médio de raízes de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. em relação ao tipo de vedação na ausência e presença de sacarose, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Rio Verde-GO, 2012.

Tipo de vedação	Ausência de sacarose	Presença de sacarose	
	Porcentagem da formação de calo		Médias
Tampa plástica	23,75 Aa ^z	43,75 Ba	33,75 A
Vedafilme	15,00 Ab	58,33 Aba	36,66 A
Algodão	10,00 Ab	77,08 Aa	43,54 A
Médias	16,25 b	59,72 a	
	Número de folhas por plântula		Médias
Tampa plástica	1,00 Aa	1,56 Aa	1,26 A
Vedafilme	0,30 Aa	0,71 Aa	0,47 A
Algodão	0,66 Ab	1,84 Aa	1,29 A
Médias	0,64 b	1,37 a	
	Comprimento médio da parte aérea (cm)		Médias
Tampa plástica	1,38 Aa	1,62 Aa	1,50 A
Vedafilme	1,02 Aa	1,21 Aa	1,10 B
Algodão	1,22 Aa	1,46 Aa	1,32 AB
Médias	1,20 a	1,44 a	
	Número de raiz por plântula		Médias
Tampa plástica	0,38 A ^z b ^Y	1,56 Aa	0,94 A
Vedafilme	0,10 Ab	2,14 Aa	0,94 A
Algodão	0,72 Ab	2,07 Aa	1,29 A
Médias	0,39 b	1,90 a	
	Comprimento médio de raízes (cm)		Médias
Tampa plástica	0,27 Ab	1,68 Aa	0,94 A
Vedafilme	0,05 Ab	2,03 Aa	0,86 A
Algodão	0,25 Ab	1,38 Aa	0,72 A
Médias	0,18 b	1,70 a	

^zMédias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna e minúscula em cada linha, não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A adição de sacarose no meio de cultivo foi o fator que mais influenciou as características estudadas. Ainda que muitos autores relatem a possibilidade de espécies se adaptarem as condições fotoautotróficas *in vitro*, a presença da sacarose foi fundamental para uma boa formação das plântulas de murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.), dentro das condições controladas que essa espécie foi cultivada.

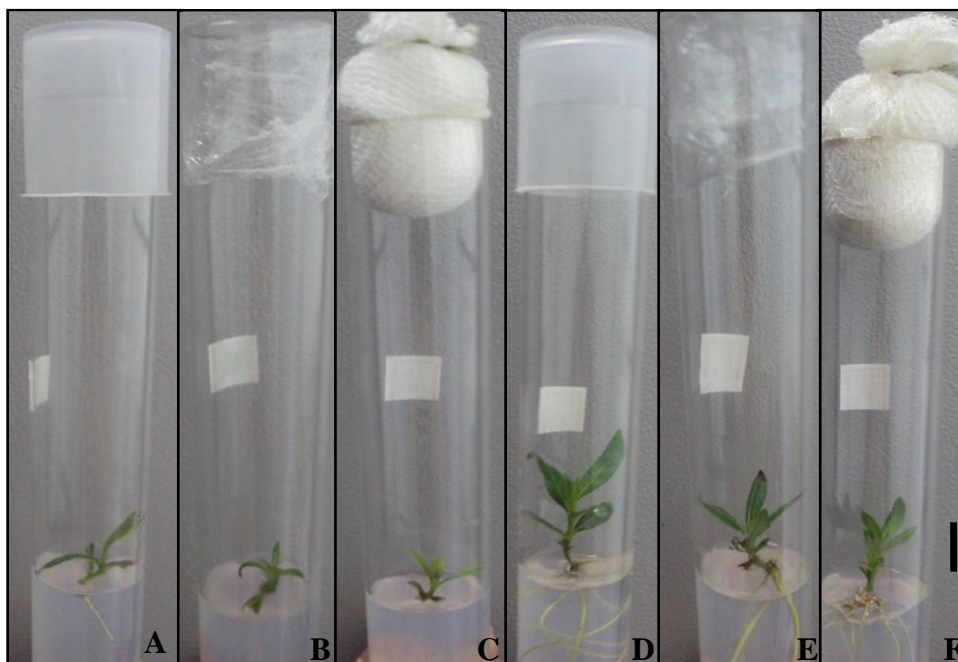


Figura 5. Plantas de *B. cydoniifolia* A. Juss. provenientes de segmentos nodais, aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tipos de vedações com presença ou ausência da sacarose: (A) vedação com tampa plástica sem sacarose ; (B) vedação com vedafilme sem sacarose; (C) vedação com tampão de algodão sem sacarose; (D) vedação com tampa plástica com sacarose ; (E) vedação com vedafilme com sacarose; (F) vedação com tampão de algodão com sacarose . Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Cíntia de Oliveira Martendal.

Resultados semelhantes foram obtidos por Costa et al (2009), na propagação *in vitro* das cultivares de Bananeiras (*Musa spp*), que indicam a utilização da sacarose no meio de cultivo tanto no alongamento como para o enraizamento. Também Hawerroth et al. (2010), verificou em seus resultados que a vedação dos frascos com vedafilme proporcionou o maior número de brotações e de folhas por explante de pereiras ‘Abate Fetel’ quando utilizadas altas concentrações de sacarose.

Resultados diferentes a estes, foram obtidos por Santana et al., (2008), ao cultivar *Annona glabra*, *in vitro* verificou que o enraizamento das brotações não depende do suprimento de sacarose no meio de cultura, em tubos fechados com o tampão de algodão ou tampa plástica. Também o enraizamento fotoautotrófico de mirtilo (*Vaccinium spp*) realizado por meio do cultivo em meio livre de sacarose aumentou o percentual de enraizamento e o número de raízes e, quando associado à vedação dos frascos com algodão, também promoveu o aumento do comprimento das raízes e da massa fresca total (Damiani & Schuch, 2009).

Para o cultivo *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss., os tipos de vedações não influenciam no seu crescimento. Porém a utilização de vedações de tampa plástica (polipropileno) ou tampão de algodão tem vantagens, por serem mais econômicas,

permitindo a reutilização do material, e é mais prático no momento de fechar os tubos de ensaio.

Além disso, as vedações com filtros permeáveis como pano ou chumaços de algodão, favorecem as trocas gasosas, reduzindo a concentração de etileno, o que resulta no melhor crescimento da planta (Kozai & Nguyen, 2003).

6.6 CONCLUSÕES

- O uso de 11,1 μM de BAP foi adequado no cultivo *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

- Para ANA, a quantidade de 13,43 foi adequada no cultivo *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

- Os tipos de vedações não influenciaram no cultivo *in vitro* de *B. cydoniifolia* A. Juss.

- O meio de cultivo na presença de sacarose influenciou o crescimento *in vitro* da espécie em estudo.

6.7 AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a FAPEG, a CAPES, programa PIBIC, IFGoiano *campus* Rio Verde, pelo auxílio financeiro e ao Centro de Treinamento da EMATER pelo fornecimento do material vegetal.

6.8 REFERÊNCIAS

ASSIS, K. C.; PEREIRA, F. D.; SANTOS, S. C.; SILVA, F. G.; SILVA, A. F.; MENEZES, C. C. E. Rendimento de explantes e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Anacardium othonianum* Rizz., oriundos de sementes armazenadas por diferentes períodos. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v.4, n.1, p.1-7, 2011.

BLAKESLEY, D. et al. The role endogenous auxin in root initiation. **Plant Growth Regulation**. Netherlands, v.10, 1991, p.341-353.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Caracterização dos pirênios e métodos para acelerar a germinação de sementes de murici do clone Açú. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.3, p.775-781, 2008.

COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; ROCHA, H. S.; PEREIRA, J. E. S.; CASTRO, E. M. de; MIYATA, L. Y. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.2, p.303-311, 2009.

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

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELO, L. A. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciências e agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p.1694-1700, 2008.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; ESPADAS, F.; QUIROZ, A.; AGUILAR, M.; COELHO, J.; SANTAMARIA, J.M. Manipulation of abiotic *in vitro* factors to improve the physiology and subsequent field performance of micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.748, p.77-86, 2007.

GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M. A.; MUNIZ, A. W.; GUIDOLIN, A. F. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.7, n.2, p.160-168, 2008.

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

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALDADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, Araraquara, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

KIELSE, P.; FRANCO, E. T. H.; PARANHOS, J. T.; LIMA, A. P. S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1098-1104, 2009.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.757-781, 2003.

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

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.)**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, MG, 88f, 2003.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.1053-1059, 2004.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.1, p.44-48, 2008.

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

RODRIGUES, M. de M.; MELO, M. das D.; ALOUFA, M. A. I. Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n. 1, p.171-173, 2006.

SAUTU, A.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C.; DEAGO, J.; CONDIT, R. Classification and ecological relationships of seed dormancy in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central America. **Seed Science Research**, Amsterdam, v.17, p.127-140, 2007.

SCARANARI, C.; LEAL, P. A. M. ; PELLEGRINO, G. Q. Estudo de simulações de microclimas em casas de vegetação visando à aclimação de mudas micropropagadas de Bananeira cv Grande Naine. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.4, p.1001-1008, 2008.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, A.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221p.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F.T., MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, 2006.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; PEREIRA, F. D., OLIVEIRA, L. M. de. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n.1, p. 80-86, 2008.

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

SOUZA, J. A.; DONINI, M. W. S. L. P.; RIBEIRO, M. F. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2046-2048, 2008.

SOUZA, J. A.; DONINI, L. P.; SILVA, L. C.; CORRÊA, M. G. S.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 em função da vedação, sacarose e material de suporte do meio de cultura. **Scientia Agraria**, Paraná, v.8, n.2, p.161-164, 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, 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**, Lavras, v.32, n.6, p.1754-1759, 2008.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SOUZA, A.G.; VILELA, X. M. S. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.2, p.109-117, 2010.

7 CONCLUSÃO GERAIS

Verificou-se que foi possível o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* do murici (*B. cydoniifolia* A. Juss.), com as seguintes conclusões:

- Há a necessidade da quebra do diásporo, para a excisão dos embriões zigóticos;
- Para a assepsia dos embriões zigóticos recomenda-se a imersão em álcool 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sódio durante 25 minutos, e germinação no meio de cultivo preparado com água e ágar, permanecendo neste durante 30 dias;
- Foi necessária a excisão das folhas cotiledonares e da radícula, para que as plântulas ficassem em contato com o meio de cultivo, em que o mais adequado foi WPM 50%, na quantidade de 20 mL, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e o pH ajustado para 5,0;
- Os tipos de vedações não influenciaram no crescimento. O meio de cultivo acrescido com 30 g L⁻¹ de sacarose foi eficiente;
- A concentração de 170 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e de 37 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e os reguladores de crescimento de 11,1 µM para BAP e de 13,43 µM para ANA, isoladamente foram adequados no cultivo *in vitro*.

Em todas as etapas, foi possível verificar o crescimento das plântulas de murici, desde a germinação dos embriões zigóticos até a fase de enraizamento. No entanto, serão necessários mais estudos referentes ao cultivo *in vitro*, visando obter um protocolo para a micropropagação dessa espécie.