

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Anacardium othonianum*
RIZZ., UMA ESPÉCIE FRUTÍFERA E MEDICINAL DO
CERRADO**

Kerlley Cristina de Assis

Engenheira Agrônoma

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL
Março – 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Anacardium othonianum*
RIZZ., UMA ESPÉCIE FRUTÍFERA E MEDICINAL DO
CERRADO**

Kerlley Cristina de Assis

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL
Março – 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KERLLEY CRISTINA DE ASSIS – filha de Adenondes Barbosa de Assis e Elzeni Alves de Assis, nascida no Município de Jataí, Goiás, em 23 de outubro de 1984. Em 2002 ingressou na Universidade Federal de Goiás – Campus Jataí onde, em 2006, obteve o título de Engenheira Agrônoma. Em março de 2008 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Agronomia na UFG, na área de Fitotecnia, defendendo a dissertação no dia 31 de março de 2010.

**À minha mãe Elzeni e às minhas primas
Karina, Laura e Júlia,**

DEDICO

**Aos amigos do Laboratório de Cultura de
Tecidos Vegetais Cerrado,**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus por ter sempre me amparado nos momentos mais difíceis e ter-me conceder forças para desenvolver minhas atividades.

Aos professores Fabiano Guimarães Silva e Flávia Dionísio Pereira pela orientação, conhecimentos transmitidos, compreensão e amizade durante toda realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí pela oportunidade de realização do curso e pela concessão de bolsa.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde por conceder espaço físico e materiais necessários para realização desta pesquisa.

Aos professores Marco Aurélio Carbone Carneiro e Edésio Fialho dos Reis por estarem à frente da Coordenação do curso de Pós-Graduação.

Aos professores Alan Carlos Costa e Sílvia Correa Santos que participaram da minha qualificação e ao professor João das Graças Santana, que participou da banca de defesa, por suas sugestões e engrandecimentos nas discussões desta dissertação.

Ao professor José Waldemar Silva pela colaboração nas análises estatísticas, atenção e sugestões.

À professora Luzia Francisca de Souza e a técnica Érica Virgínia Estêfane de Jesus Amaral, do Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí, por identificar o material vegetal.

Ao professor Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho e Jaqueline Martins Vasconcelos pelo auxílio nas análises anatômicas.

Aos mestrandos e estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Cerrado que com tanta dedicação contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos colegas de curso pela convivência agradável. Em especial à Vania Klein, Solange Neis e Aurélio Rúbio Neto: vocês são como irmãos.

Aos funcionários da Universidade Federal de Goiás: Eleuzimone, Marinalva e Jefferson e, à Carla, funcionária do Instituto Federal Goiano. Muito obrigado!

À minha mãe Elzeni Alves de Assis pelo incentivo e carinho sempre dedicado.

Ao meu noivo Newton Alex Mayer pela compreensão, incentivo, auxílio e apoio nos momentos mais críticos.

À minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Agradeço em especial meus primos Karina, Laura, Julia e Ulisses Filho que me acolheram em seu lar durante todo o tempo que estive na cidade de Rio Verde.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 O Cerrado Brasileiro.....	1
1.2 Caracterização botânica de <i>Anacardium othonianum</i> Rizz.....	2
1.2.1 Caracterização das espécies <i>A. humile</i> St. Hill, <i>A.</i> <i>nanum</i> St. Hill e <i>A. corymbosum</i> Barb. Rod.....	6
1.3 Micropropagação.....	7
1.3.1 Meios nutritivos.....	8
1.3.2 Reguladores de crescimento.....	9
1.3.3 Luminosidade.....	10
1.3.4 Polaridade dos explantes.....	10
1.3.5 Estímulo ao fotoautotrofismo e anatomia.....	10
1.4 Objetivos.....	12
1.5 Referências Bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 2. RENDIMENTO DE EXPLANTES E ESTABELECIMENTO IN VITRO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Anacardium</i> <i>othonianum</i> RIZZ., ORIUNDOS DE SEMENTES ARMAZENADAS POR DIFERENTES PERÍODOS.....	19
Resumo.....	19
Abstract.....	20
2.1 Introdução.....	21
2.2 Material e Métodos.....	22
2.3 Resultados e Discussão.....	24
2.4 Conclusão.....	28
2.5 Referências Bibliográficas.....	28
CAPÍTULO 3. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Anacardium othonianum</i> RIZZ.: I INFLUÊNCIA DOS SAIS E VOLUMES DO MEIO DE CULTURA.....	31

Resumo.....	31
Abstract.....	32
3.1 Introdução.....	33
3.2 Material e Métodos.....	34
3.3 Resultados e Discussão.....	38
3.4 Conclusões.....	47
3.5 Referências Bibliográficas.....	47
CAPÍTULO 4. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Anacardium othonianum</i> RIZZ.:	
II INFLUÊNCIA DO REGULADOR DE CRESCIMENTO,	
ORIENTAÇÃO DO EXPLANTE E	
LUMINOSIDADE.....	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
4.1 Introdução.....	53
4.2 Material e Métodos.....	54
4.3 Resultados e Discussão.....	58
4.4 Conclusões.....	66
4.5 Referências Bibliográficas.....	66
CAPÍTULO 5. EFEITO DA SACAROSE E DA VEDAÇÃO NA	
ANATOMIA FOLIAR DE BROTAÇÕES DE	
<i>Anacardium othonianum</i> RIZZ. CULTIVADOS <i>IN</i>	
<i>VITRO</i>.....	70
Resumo.....	70
Abstract.....	71
5.1 Introdução.....	72
5.2 Material e Métodos.....	73
5.3 Resultados e Discussão.....	75
5.4 Conclusões.....	86
5.5 Referências Bibliográficas.....	86

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 Tempo de coleta e número de explantes totais coletados em diferentes tempos de armazenamento das sementes de <i>A. othonianum</i> Rizz. Rio Verde, GO. 2009.....	27
Tabela 3.1 Percentual de sobrevivência de plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz. aos 30 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações do meio MS e WPM. Rio Verde, GO, 2009.....	39
Tabela 3.2 Análise de contrastes entre os tratamentos para número médio de folhas e gemas de <i>A. othonianum</i> Rizz., aos 30 e 60 dias de cultivo, em diferentes concentrações dos meios MS e WPM. Rio Verde, GO, 2009.....	41
Tabela 3.3 Comprimento médio de plântulas e de folhas de <i>A. othonianum</i> Rizz., aos 30 e 60 dias de cultivo, em diferentes volumes dos meios de cultura. Rio Verde, GO, 2009.....	43
Tabela 3.4 Análise de contrastes entre os tratamentos para o número de folhas e gemas de <i>A. othonianum</i> Rizz., aos 30 e 60 dias de cultivo, em diferentes volumes dos meios de cultura. Rio Verde-GO, 2009.....	45
Tabela 4.1 Análise de contrastes entre os tratamentos para número de folhas e gemas de <i>A. othonianum</i> Rizz., aos 30 e 60 dias, em função da relação auxina/citocinina. Tratamentos (μ M): (T1) 0 ANA + 0 BAP; (T2) 0 ANA + 4,44 BAP; (T3) 0 ANA + 8,88 BAP; (T4) 5,37 ANA + 0 BAP; (T5) 5,37 ANA + 4,44 BAP; (T6) 5,37 ANA + 8,88 BAP; (T7) 10,74 ANA + 0 BAP; (T8) 10,74 ANA + 4,44 BAP; (T9) 10,74 ANA + 8,88 BAP. Rio Verde, GO, 2009..	60
Tabela 4.2 Comprimento médio de plântulas e de folhas de <i>A. othonianum</i> Rizz. aos 30 e 60 dias de cultivo, em função da orientação do explante e luminosidade. Rio Verde-GO, 2009.....	62

Tabela 4.3	Análise de contrastes entre os tratamentos para número de folhas e gemas de <i>A. othonianum</i> Rizz. aos 30 e 60 dias de cultivo, em função da orientação do explante e condições de incubação. OV = orientação vertical; OH = orientação horizontal; P = presença de luz; A = ausência de luz. Rio Verde-GO, 2009.....	64
Tabela 5.1	Comprimento médio de plântulas e de folhas de <i>A. othonianum</i> Rizz., aos 30 e 60 de cultivo <i>in vitro</i> , em função da presença ou ausência de sacarose no meio de cultivo e dos tipos de vedações dos tubos de ensaio. Rio Verde, GO, 2009.....	77
Tabela 5.2	Análise de contrastes entre os tratamentos para o número de folhas de <i>A. othonianum</i> Rizz., aos 30 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em função da presença ou ausência de sacarose no meio de cultivo e tipos de vedações dos tubos de ensaio. (S) = meio com sacarose; (s/S) = meio sem sacarose; (T) = tampa plástica sem PVC; (T. PVC) = tampa plástica com PVC; (TA) = tampão de algodão. Rio Verde, GO, 2009.....	79
Tabela 5.3	Médias do número de células epidérmicas, número de estômatos, densidade estomática (mm ²) e índice estomático (%) em folhas de <i>A. othonianum</i> Rizz. cultivados <i>in vitro</i> , para face adaxial e abaxial, em função da presença ou ausência de sacarose no meio e diferentes tipos de vedações dos tubos de ensaio. Rio Verde, GO, 2009.....	82
Tabela 5.4	Espessura da epiderme face adaxial e abaxial e mesófilo (µm) em folhas de <i>A. othonianum</i> Rizz. cultivados <i>in vitro</i> , em função da presença ou ausência de sacarose no meio e diferentes tipos de vedações dos tubos de ensaio. Rio Verde, GO, 2009.....	83

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Frutos coletados da planta matriz em estudo. Rio Verde, GO, 2008. Barra= 20 mm. Foto: Kerlley Cristina de Assis.....	2
Figura 1.2	Aspecto visual de uma planta adulta de <i>A. othonianum</i> Rizz. Montes Claros, GO, 2008. Foto: Fabiano Guimarães Silva.....	4
Figura 1.3	Variabilidade da coloração e forma do pseudofruto de <i>A. othonianum</i> Rizz., Frutos oriundos de plantas diferentes com mesmo grau de maturação (A) , (B) , (C) , (D) . Rio Verde, GO, 2008. Barra= 20 mm. Foto: Kerlley Cristina de Assis.....	5
Figura 2.1	Planta matriz de <i>A. othonianum</i> Rizz. Com frutos (A) ; secagem de sementes em sílica gel (B) ; sementes semeadas em bandejas (C) ; plantas germinadas em bandejas (D) ; ápices retirados de plantas germinadas em bandejas (E) ; segmento nodal estabelecido <i>in vitro</i> (F) . Rio Verde-GO, 2009. Barra= 10mm.....	25
Figura 2.2	Porcentagem de emergência de plantas de <i>A. othonianum</i> Rizz. em função do tempo de armazenamento. Rio Verde-GO, 2009.....	26
Figura 2.3	Índice de velocidade de emergência de plantas de <i>A. othonianum</i> Rizz. em função do tempo de armazenamento. Rio Verde-GO, 2009.....	26
Figura 3.1	Comprimento médio de plântulas (A e C) , comprimento médio de folhas (B e D) de <i>A. othonianum</i> Rizz., respectivamente aos 30 e 60 dias; em diferentes concentrações dos meios MS e WPM. Rio Verde, GO, 2009.....	39
Figura 3.2	Plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz., aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações dos meios MS e WPM. Rio Verde, GO. 2009. Barra= 10mm.....	40
Figura 3.3	Plântulas de <i>A. othonianum</i> Rizz., aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Meio MS 50% com diferentes volumes (mL) (A) ; Meio WPM com diferentes volumes (mL) (B) . Rio Verde, GO. 2009. Barra= 10mm.....	46

- Figura 4.1** Plântulas de *A. othonianum* Rizz. aos 60 dias de cultivo. Tratamentos (μM): **(T1)** 0 ANA + 0 BAP; **(T2)** 0 ANA + 4,44 BAP; **(T3)** 0 ANA + 8,88 BAP; **(T4)** 5,37 ANA + 0 BAP; **(T5)** 5,37 ANA + 4,44 BAP; **(T6)** 5,37 ANA + 8,88 BAP; **(T7)** 10,74 ANA + 0 BAP; **(T8)** 10,74 ANA + 4,44 BAP; **(T9)** 10,74 ANA + 8,88 BAP. Barra= 10 mm. Rio Verde, GO, 2009..... 59
- Figura 4.2** Comprimento médio de plântulas **(A e C)**, Comprimento médio de folhas **(B e D)** de *A. othonianum* Rizz., respectivamente, aos 30 e 60 dias de cultivo, em função da relação auxina/citocinina (μM). Médias e erro padrão (n=25). Rio Verde, GO, 2009..... 60
- Figura 4.3** Sementes cultivadas em bandejas **(A)**; plantas germinadas em bandejas **(B)**; ápice retirado de plantas germinadas em bandejas **(C)**; segmento nodal estabelecido *in vitro* **(D)**; plântulas de *A. othonianum* Rizz., aos 60 dias de cultivo **(E, F, G, H)**. Orientação vertical **(OV)**; orientação horizontal **(OH)**; presença de luz **(P)**; ausência de luz **(A)**. Rio Verde-GO, 2009. Barra= 10mm..... 65
- Figura 5.1** Influência da sacarose e da vedação na anatomia foliar de brotações de *A. othonianum* Rizz. cultivados *in vitro*. **1.** Explantes preestabelecidos *in vitro*; **2.** Explante a ser inoculado; **3.** Tipos de vedações usadas; **4.** Plântulas aos 30 dias de cultivo *in vitro*; **5.** Plântulas aos 60 dias de cultivo *in vitro*; **6.** Coleta da segunda folha expandida; **7.** Fixação das folhas em FAA; **8.** Conservação em álcool 70%; **9.** Cortes anatômicos. Rio Verde, GO, 2009..... 76
- Figura 5.2** Vista frontal de folhas de *A. othonianum* Rizz. cultivados *in vitro*. **A.** face adaxial; **B.** face abaxial. **Cc.** Célula comum, **Cs.** Célula subsidiária, **Es.** Estômatos. Barras= 50 μm . Rio Verde, GO, 2009..... 84
- Figura 5.3** Seções transversais de folhas de *A. othonianum* Rizz. cultivadas *in vitro*. **Cs:** Canal secretor, **Ep:** epiderme, **Ev:** elemento de vaso, **Fl:** floema, **Pl:** parênquima esponjoso, **Pp:** parênquima paliçádico, **Tr:** Tricoma, **Xi:** Xilema. Barras: A:100 μm ; A-F: 50 μm . Rio Verde, GO, 2009..... 84

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Anacardium othonianum* RIZZ., UMA ESPÉCIE FRUTÍFERA E MEDICINAL DO CERRADO

RESUMO – O *Anacardium othonianum* Rizz., conhecido como caju de árvore do cerrado, é uma espécie frutífera e medicinal nativa desse bioma com grande potencial econômico. Visto que a expansão agrícola na região do Cerrado foi acompanhada pela redução da vegetação nativa, a micropropagação tem contribuído de forma significativa na propagação de várias espécies, originando mudas uniformes com alta sanidade para plantios comerciais e recuperação de áreas degradadas. Neste trabalho foram aplicadas técnicas para estudar alguns fatores que interferem na micropropagação de *A. othonianum* Rizz, não existindo relatos na literatura sobre estudos de tais aspectos para essa espécie. Os resultados indicam que a condição de armazenamento das sementes foi satisfatória no fornecimento de explantes para utilização nos ensaios de micropropagação por até 275 dias. Com a utilização de segmentos nodais observou-se que os meios MS (50 e 25%) e WPM (100 e 50%) foram mais eficientes na regeneração de plântulas e, os melhores volumes de meio foi de 15 e 25 mL em tubos de ensaio contendo meio MS (50%). Os meios de cultura suplementados com até 8,88 µM de BAP e 4,44 µM de ANA não sortiram efeito na multiplicação dos segmentos nodais. Ainda, verificou-se que a melhor resposta morfofisiológica foi obtida inoculando os segmentos nodais na orientação horizontal na presença de luz e, que a sacarose e o tampão de algodão influenciam na adaptação das plântulas de *A. othonianum* Rizz. produzidas *in vitro*.

Palavras-chave: caju, fotoautótrofo, micropropagação

**IN VITRO PROPAGATION OF *Anacardium othonianum* RIZZ., A SAVANNAH
FRUITING AND MEDICINAL SPECIES**

ABSTRACT – *Anacardium othonianum* Rizz., known as caju de árvore do cerrado, is a fruiting and medicinal species native of the savannah ecosystem, with great economic potential. Since agricultural expansion in the savannah was followed by the reduction of native vegetation, micro propagation has significantly contributed for the propagation of several species, resulting in uniform healthy seedlings for commercial plantings and the revegetation of degraded areas. This study used techniques to determine some factors affecting micro propagation of *A. othonianum* Rizz, since there are no reports for this species in the literature. The results indicate that storage conditions for the seeds were good to supply explants for use in the micro propagation trials for up to 275 days. The media MS (50 and 25%) and WPM (100 and 50%) were more effective for the regeneration of seedlings from nodal segments, and the best medium volume were 15 and 25 mL in test tubes containing the medium MS (50%). The culture media amended with up to 8.88 μ M BAP and 4.44 μ M ANA had no effect on the multiplication of nodal segments. Also, the best morpho-physiological response was obtained by inoculating the nodal segments horizontally, in the presence of light, and sucrose and the cotton plug affected the adaptation of *A. othonianum* Rizz. seedlings produced *in vitro*.

Keywords: cashew, photoautotrophic, micropropagation

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O CERRADO BRASILEIRO

Em virtude de suas características ecológicas, geopolíticas, demográficas, sócio-econômicas e culturais, o Cerrado é considerado o bioma de integração nacional, ocupando uma área que cobre uma extensão estimada em 1,3 milhões de quilômetros quadrados do território brasileiro, distribuídos entre a totalidade do Distrito Federal, mais da metade dos Estados de Goiás (97%), Tocantins (91%), Maranhão (65%), Mato Grosso do Sul (61%), Minas Gerais (57%), além de porções de outros 6 Estados (Pinto, 1990; Brandão, 1996; IBGE, 2004).

O grande desenvolvimento agrícola na região do Cerrado foi acompanhado pela redução da vegetação nativa e, essa rica formação vegetal vem sofrendo uma rápida depredação, principalmente devido à exploração extrativista por parte do homem. Não deixando de reconhecer o potencial econômico dessa região, acredita-se que estas áreas podem ser exploradas economicamente se feita de maneira racional e ordenada, não destruindo suas riquezas e recompondo as áreas degradadas (Valle Filho, 1991).

A região do Cerrado brasileiro é caracterizada por vegetação rasteira, formada principalmente por gramíneas, coexistindo com árvores esparsas, baixas, tortuosas, de casca grossa, com folhas largas e sistema radicular profundo. Essa vegetação possui estratégias de adaptação à seca: germinação de sementes na época das chuvas, crescimento radicular pronunciado nos primeiros estádios de desenvolvimento, podendo alcançar profundidades superiores à 10m quando adultas (Sano & Almeida, 1998).

Muitas espécies nativas são importantes por produzirem madeira, resinas, látex, produtos medicinais, sendo também fornecedoras de frutos comestíveis entre outros. Devido às suas características de interesse econômico, estas espécies tornam mais susceptíveis a destruição na medida em que nelas se procuram produtos comercialmente mais valiosos que os frutos. Os modelos recomendados de agricultura sustentável, dos quais se procura obter uma produção agrícola compatível com a manutenção dos recursos e garantia das futuras gerações, são mais facilmente

colocados em prática recorrendo às culturas perenes, onde se inclui a maior parte das espécies produtoras de frutos comestíveis (Ferrão, 1999).

A maioria dos frutos de espécies nativas do Cerrado brasileiro possui elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais, além de um sabor característico sem igual. Essas propriedades tornam-os mais atrativos ao mercado, abrindo perspectivas para fins agroindustriais. Na indústria de sucos, polpas, sorvetes, picolés e geléias a demanda interna por novos sabores é crescente. O mercado externo poderá também ser conquistado com sucesso, por se tratarem de frutos exóticos com sabores e aromas ainda desconhecidos por muitos países (Silva et al., 2001).

1.2 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA de *Anacardium othonianum* Rizz.

De acordo com a classificação de Rizzini in: (Joly, 1993), o *Anacardium othonianum* tem a seguinte posição sistemática:

Divisão: Magnoliophyta,

Classe: Magnoliopsida,

Ordem: Sapindales,

Família: Anacardiaceae,

Gênero: *Anacardium*.

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pela Professora Dr^a. Luzia Francisca de Souza, do Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí, cuja excicata tem o número 3793 (Figura 1.1).



Figura 1.1. Frutos coletados da planta matriz em estudo. Rio Verde, GO, 2008. Barra= 20 mm. Foto: Kerlley Cristina de Assis.

Dentre as espécies nativas do Cerrado brasileiro, o *A. othonianum* Rizz. se destaca devido a importância econômica para região em que se encontra. É conhecido popularmente como caju de árvore do cerrado, cajuzinho e cajuí, distinguindo-se das demais espécies existentes na região Central do Brasil pelo porte arbóreo. A altura das plantas e o diâmetro de sua copa variam de 3 a 4 metros (Figura 1.2). A planta tolera bem os períodos de secas e os solos pobres, com pH entre 4,5 - 6,5. As folhas são elípticas, coriáceas, glabras, com base subcordata e pecíolos medindo 4-8 mm. As flores são reunidas em panículas amplas, as brácteas são foliosas, pilosas e as pétalas estreitas, alongadas e avermelhadas. As flores são hermafroditas e unissexuais (masculinas), sendo que as masculinas aparecem no início da floração e as hermafroditas no final. As flores são polinizadas por abelhas e vespas e o florescimento ocorre entre junho e outubro (Silva et al., 2001; Lima et al., 2002).

As plantas do gênero *Anacardium* podem ser propagadas de forma sexuada, por meio do plantio de sementes, ou de forma assexuada, com a utilização de partes vegetativas da planta, como enxertia e estaquia. É uma planta predominantemente alógama e para que uma flor possa ser fecundada há necessidade do pólen de outra flor. Embora seja possível o cruzamento de flores de uma mesma planta, normalmente o que acontece é a polinização com pólen de plantas localizadas na vizinhança (Barros & Crisóstomo, 1995; Silva et al., 2001, Oliveira, 2008).



Figura 1.2. Aspecto visual de uma planta adulta de *A. othonianum* Rizz. Montes Claros, GO, 2008. Foto: Fabiano Guimarães Silva.

A castanha, fruto verdadeiro, é um aquênio cujo pedúnculo se desenvolve em pseudofruto, este possui forma de pêra e a coloração pode variar do amarelo ao vermelho (Figura 1.3). Os pseudofrutos possuem de 2 a 4 cm de comprimento por 2 a 3 cm de diâmetro, com massa variando de 5 a 12 g; contém elevado valor nutritivo, relacionado principalmente ao alto teor de vitamina C. Também é fonte de fibras, rico em compostos fenólicos, em especial taninos, que confere adstringência ao pedúnculo (Silva et al., 2001; Paiva et al., 2003; Lima et al., 2004).

Os frutos, que ocorrem entre 200 e 600 por planta, são colhidos entre setembro e outubro a partir do segundo ou terceiro ano de vida da planta (Mendonça et al., 1998). No entanto, de acordo com o que tem sido observado nas coletas a campo, a produção

é irregular entre um ano e outro, podendo ser encontrado maior ou menor número de frutos por planta.

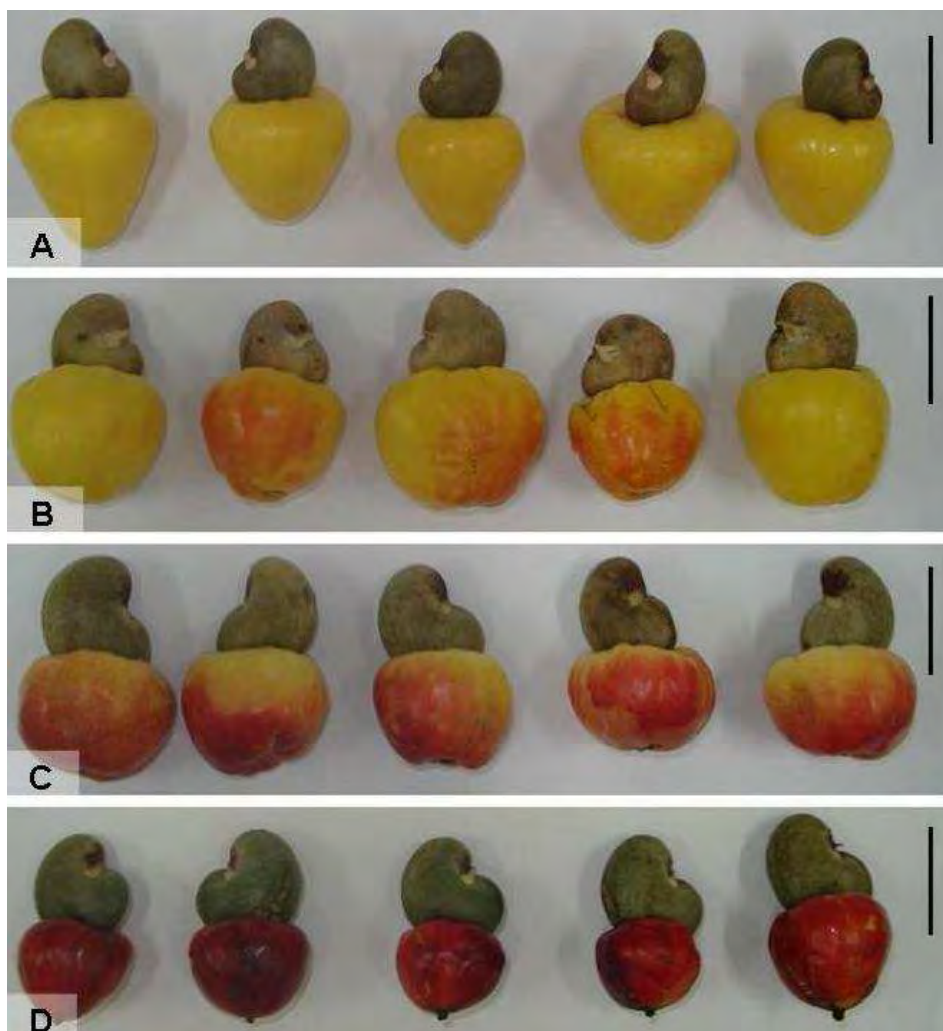


Figura 1.3. Variabilidade da coloração e forma do pseudofruto de *A. othonianum* Rizz., Frutos oriundos de plantas diferentes com mesmo grau de maturação (A), (B), (C), (D). Rio Verde, GO, 2008. Barra= 20 mm. Foto: Kerley Cristina de Assis.

Em trabalhos realizados por Silva et al. (2008), foram investigados os valores nutricionais de frutos das espécies nativas do Cerrado. Em pseudofruto de *A. othonianum* Rizz. foram verificados: valor protéico de $1,18 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$; lipídios $0,63 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$; carboidratos $6,97 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$; fibra alimentar $4,26 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$; resíduo mineral fixo $0,33$

g.100g⁻¹; valor energético total de 38,27 kcal.100g⁻¹. A composição mineral foi de 15 mg.100g⁻¹ de cálcio, 0,65 mg.100g⁻¹ de zinco e 0,26 mg.100g⁻¹ de ferro.

O pseudofruto rico em vitamina C e ferro é também saboroso, ácido e refrigerante, considerado anti-sifilítico. Os frutos são oleaginosos, com pericarpo idêntico ao do caju (*A. occidentale* L.) do qual se extrai óleo-resina igualmente aplicado para combater as moléstias cutâneas. A casca do caule é empregada para sanar problemas intestinais e as flores são utilizadas como expectorantes (Silva et al., 2001).

O aproveitamento alimentar do pseudofruto de *A. othonianum* Rizz. é feito principalmente na forma de polpa *in natura* ou em forma de sucos, licores, doces, geléias, rapaduras, produtos cristalizados e aguardentes. A castanha torrada é consumida com sal ou na forma de paçoca doce ou salgada (Lima et al., 2004).

1.2.1 Caracterização das espécies *A. humile* St. Hill, *A. nanum* St. Hill e *A. corymbosum* Barb. Rod.

Além do *A. othonianum*, outras três espécies são típicas do Brasil Central: *A. humile*, *A. nanum* e *A. corymbosum*. Devido à dificuldade de identificação das diferentes espécies de *Anacardium* nativos do Cerrado brasileiro, faz-se necessário a caracterização dos mesmos para melhor diferenciação entre eles.

O *Anacardium humile* St. Hill é conhecido popularmente como cajuí, caju do campo, caju do cerrado, cajuzinho do cerrado, caju mirim, cajuzinho do mato e caju anão. A planta é um subarbusto que pode medir de 30 a 150 cm, possui tronco ereto e sistema radicular profundo medindo entre 15 e 18 m. As folhas são coriáceas com base geralmente atenuada e assimétrica, são glabras nas duas superfícies, com pecíolo medindo até 15 mm. As flores são bissexuais e florescem entre os meses de julho e setembro e são polinizadas por abelhas e borboletas (Sano & Almeida, 1998).

O *Anacardium nanum* St. Hill, conhecido como cajuzinho ou caju rasteiro, é um subarbusto que mede de 30 a 150 cm, com tronco subterrâneo de 35-65 cm de diâmetro. As folhas são frequentemente sésseis, coriáceas, com base geralmente

auriculata e assimétrica. As flores são bissexuais, o florescimento ocorre entre os meses de maio e agosto e são polinizadas por abelhas e borboletas (Vieira et al., 2006).

O *Anacardium corymbosum* Barb. Rod., também conhecido como caju rasteiro e cajuzinho, é um subarbusto que pode medir entre 50 e 150 cm, cujo o tronco é subterrâneo com ramificações ascendentes rígidas. As folhas são coriáceas com base geralmente auriculata, assimétrica e ausência de pecíolo. As flores são bissexuais e o florescimento ocorre entre junho e outubro, iniciando a frutificação em outubro. É comum a associação desta espécie com o *A. humile* (Vieira et al., 2006).

1.3 MICROPROPAGAÇÃO

Estudos têm sido realizados visando a produção de mudas de plantas lenhosas, principalmente frutíferas nativas, para serem utilizadas na expansão florestal, no reflorestamento de áreas degradadas e na implantação de pomares comerciais. Vários problemas como a alta perecibilidade do pseudofruto, a assincronia no amadurecimento, a alternância de safras e as dificuldades de propagação têm inviabilizado a exploração racional de várias espécies, dentre elas, *A. othonianum* Rizz. Algumas destas dificuldades têm sido superadas utilizando mudas uniformes, originadas principalmente pela cultura de tecidos (Ferrão, 1999; Paiva et al., 2002).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido recorridas quando a propagação sexuada é insatisfatória, ou seja, quando a progênie obtida é muito heterogênea ou em casos em que a propagação por semente não ocorra naturalmente. Desta forma, o cultivo *in vitro*, através da micropropagação, é um método viável para a propagação de diversas espécies, proporcionando produção de mudas com alta sanidade e populações com plantas homogêneas, além de acelerar os métodos de propagação convencional como a enxertia e estaquia (Pierik, 1990; Souza et al., 2007).

A micropropagação pode ser dividida em três etapas: Etapa 1- seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento do cultivo *in vitro*; Etapa 2- multiplicação e Etapa 3- enraizamento e transferência das plantas obtidas *in vitro* para o ambiente externo. Uma etapa anterior à seleção dos explantes pode ser citada e, nesta fase

realiza-se a seleção de plantas matrizes que não têm deficiência nutricional e hídrica, as quais, geralmente, fornecem explantes com melhor qualidade por possuírem elevada fitossanidade (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para a seleção dos explantes devem ser considerados o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação. Tendo em vista a totipotência das células vegetais, teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como fonte de explante. Entretanto, na prática, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham melhor capacidade de expressar a totipotência. Em geral, na maioria dos trabalhos de micropropagação com frutíferas, os explantes escolhidos são as gemas apicais e axilares (Bassan et al., 2006; Souza et al., 2007).

Em cada uma das fases da micropropagação vários fatores podem influenciar o cultivo *in vitro*, dentre eles estão: o meio de cultura utilizado, a relação entre os reguladores de crescimento, a orientação dos explantes e as condições de cultivo *in vitro* para cada espécie.

1.3.1 Meios nutritivos

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

Diversas formulações dos meios de cultura têm sido empregadas no cultivo *in vitro*, que diferem entre si basicamente em relação à concentração de sais. O meio MS é o mais utilizado na propagação *in vitro* de diversas espécies, promovendo resultados positivos na multiplicação de segmentos nodais, no desenvolvimento de embriões e na indução de embriogênese somática em explantes foliares. Com espécies lenhosas, o meio MS não foi satisfatório em alguns casos e, composições mais diluídas em

macronutrientes promovem um melhor desempenho. Entretanto, para cada tipo de explante, espécie ou cultivar o meio de cultura mais adequado deve ser determinado experimentalmente (Lédo et al., 2007; Rezende et al., 2008).

1.3.2 Reguladores de crescimento

Ao meio de cultura geralmente são adicionados reguladores de crescimento, com o objetivo de suprir deficiências dos teores endógenos de fitormônios nos explantes e, as classes de reguladores mais utilizadas na cultura *in vitro* são as auxinas e citocininas. Embora nem sempre sejam necessárias no meio de multiplicação, as auxinas têm sido utilizadas para promover o crescimento de calos, suspensões celulares e, em combinação com as citocininas, regular a morfogênese estabelecendo o equilíbrio adequado entre os reguladores de crescimento (Silveira et al., 2002).

As auxinas são de ocorrência natural nas plantas, capazes de iniciar a divisão celular e estão envolvidas na formação dos meristemas originados de tecidos não organizados ou de órgão definido. Entre as auxinas naturais, o AIA (ácido indol acético) é o composto de maior utilização. Também são amplamente utilizados compostos com efeito fisiológico similar e que são produzidos artificialmente, chamados auxinas sintéticas, entre as quais estão ANA (ácido naftalenoacético), 2,4-D (ácido 2-4 diclorofenoxiacético) e AIB (ácido indolbutírico) (Silveira et al., 2002; Brum et al., 2002).

Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP (6-Benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies lenhosas, sendo utilizado em aproximadamente 60% dos meios de cultivo. As citocininas são indispensáveis à divisão celular, à quebra de dominância apical, à indução e à proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias. A fonte de citocinina assim como sua concentração são os fatores que mais influenciam o processo de desenvolvimento *in vitro*. (Mantovani et al., 2001; Brum et al., 2002; Souza et al., 2003; Cordeiro et al., 2004).

1.3.3 Luminosidade

Diferentes respostas das plântulas durante a micropropagação não são promovidas apenas pelos fatores inertes ao explante ou meio de cultivo, mas também por modificações do ambiente *in vitro* que interferem no número de folhas, no teor de clorofila, na fotossíntese e assim, determinando a taxa de sobrevivência das mudas na fase de aclimatização. Um dos principais fatores que causam influência na fotossíntese de plântulas cultivadas *in vitro* é a luz, sendo que a quantidade, qualidade e fotoperíodo podem afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vivo* e *in vitro* (Fogaça et al., 2007).

1.3.4 Polaridade dos explantes

A posição do explante sobre o meio de cultura parece desempenhar função importante na calogênese e organogênese. Os explantes inoculados *in vitro* exibem polaridade na proliferação celular e na morfogênese, que por sua vez estão relacionados com a posição e/ou orientação em que o órgão ou tecido tem na planta intacta e, também sua orientação dentro do recipiente de cultivo (Santos et al., 2009).

A polaridade pode ser explicada quando um segmento de tecido é cortado, assim a unidade fisiológica é perdida podendo causar a redistribuição de algumas substâncias, provavelmente auxinas, o que explica diferentes respostas no crescimento. A polaridade varia com o genótipo e pode, em alguns casos, ser revertido pelo tratamento com reguladores de crescimento. A adição de auxinas e citocininas no meio de cultura podem reforçar a polaridade que é geralmente observada nos explantes, induzindo a regeneração de partes não responsivas de órgãos (Santana et al., 2009).

1.3.5 Estímulo ao fotoautotrofismo e anatomia

No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carbono. A sacarose é o

carboidrato mais utilizado nos meios de cultura *in vitro* de tecidos vegetais, fornecendo cadeias de carbono e energia para as plantas sintetizarem os compostos orgânicos necessários ao crescimento dos explantes (Nicoloso et al., 2003; Villa et al., 2009).

Em virtude destas condições e das dificuldades de trocas gasosas, há a ocorrência de alterações na anatomia e fisiologia dos órgãos vegetativos das plantas micropropagadas. Dentre estas alterações estão: células das paredes pouco espessas, com abundância de espaços intercelulares; sistema vascular pouco desenvolvido; aumento na frequência de estômatos e deficiência no mecanismo de fechamento destes (Calvete et al., 2002; Rodrigues et al., 2006; Pereira et al., 2007).

Dessa forma, alguns autores têm sugerido adotar na última fase da cultura *in vitro* a diminuição da concentração de sacarose, com o objetivo de elevar a taxa fotossintética e capacitar a planta à nutrição autotrófica e, assim facilitar a aclimatização da planta micropropagada (Mothé et al., 2008; Villa et al., 2009).

Quando as plantas são cultivadas *in vitro* em meio de cultura sem sacarose, surge ainda a necessidade de aumentar a difusão do CO₂ e diminuir a umidade dentro dos frascos, para promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca. Com relação a estes fatores, têm-se conseguido resultados positivos com a utilização de tampas mais permeáveis, aumentando a aeração das culturas (Santana et al., 2008; Nepomuceno et al., 2009).

A maior concentração de CO₂ promove o acréscimo na fotossíntese e na regulação estomática, preparando as plantas para as condições autotróficas. As trocas gasosas elevam as taxas de transpiração, favorecendo a formação de cutícula nas folhas e o funcionamento normal dos estômatos, melhorando a tolerância ao estresse e facilitando a aclimatização das plantas (Inoue et al., 1998; Pereira et al., 2007).

Diante da necessidade de preservação de *A. othonianum* Rizz. no o bioma Cerrado e em virtude da inexistência de trabalhos utilizando a micropropagação para a espécie, faz-se necessário o aprimoramento das técnicas de cultura de tecidos para que se torne viável a sua multiplicação vegetativa em escala comercial.

1.4 OBJETIVOS

Conforme o exposto, o objetivo deste trabalho foi contribuir para a definição de protocolo *in vitro* de *Anacardium othonianum* Rizz. mediante ao estudo de fatores como armazenamento de sementes, meios de cultura, balanço auxina/citocinina, orientação dos explantes, concentração de sacarose e diferentes tipos de vedações.

Objetivos específicos:

- 1) Desenvolver metodologia para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Anacardium othonianum* Rizz., utilizando sementes armazenadas, formando um sistema contínuo de fornecimento de explantes para estudos *in vitro* desta espécie;
- 2) Testar os efeitos de diferentes concentrações de sais e volumes do meio de cultura;
- 3) Avaliar a relação auxina/citocinina, orientação dos explantes e a luminosidade na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.;
- 4) Avaliar a influência da sacarose e da vedação na anatomia foliar de brotações de *A. othonianum* Rizz.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R. Melhoramento Genético do Cajueiro. In: ARAÚJO, J. P. P. e SILVA, V. V. **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção**. EMBRAPA-CNPAT, Fortaleza, 1995. p. 73-96.

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

BRANDÃO, M.; GAVILANES, M. L.; LACA-BUENDIA, J. P. **Plantas medicamentosas dos campos rupestres no estado de Minas Gerais**. Segundo Seminário Mineiro de Plantas Mediciniais. Lavras: UFLA, 1996. 37 p.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição Especial, 2002.

CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 20, 2002.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, 2004.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura Tropical: Espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, v. 1, p. 75-84, 1999.

FOGAÇA, L. A.; DORTZBACH, D.; ALVES, A. C.; PEDROTTI, E. L. Características morfofisiológicas de brotos micropropagados de agapantho sob diferentes intensidades luminosas e concentrações de sacarose. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 371-378, 2007.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de Biomas e de Vegetação. Comunicação Social 21 maio 2004.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias_impreso.php?id_noticia=169>. Acesso em: 23 fev. 2010.

INOUE, M. T.; GRAÇA, M. E. C.; CORREA, G. Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 36, 1998.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia Vegetal**, 2ed. São Paulo: Nacional, 1993. 739p.

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, 2007.

LIMA, A. A. C.; OLIVEIRA, F. N. S.; AQUINO, A. R. L. Solos. In: BARROS, L. M. **Caju. Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. cap. 5, p.26-31.

LIMA, A. C.; GARCIA, N. H. P.; LIMA, J. R. **Obtenção e caracterização dos principais produtos do caju**. Boletim CEPPA, v. 22, n. 1, p. 133-144, 2004.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo [*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, 2001.

MONTHÉ, G. P. B.; NETTO, A. T.; CRESPO, L. E. C.; CAMPOSTRINI, E. Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade da luz. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 84-91, 2008.

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

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.

OLIVEIRA, V. H. de. Cajucultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, 2008.

PAIVA, R.; GOMES, G. A. C.; SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, P. D. de O.; DOMBROSKI, J. L. D.; SANTOS, R. S. Espécies frutíferas com potencial econômico: avanços no processo de propagação. **Informe Agropecuário: produção e certificação de mudas de plantas frutíferas**, Belo Horizonte: EPAMIG, v. 23, n. 216, p. 78-84. 2002.

PAIVA, J. R.; CRISOSTOMO, J. R.; BARROS, L. M. **Recursos Genéticos do cajueiro**: coleta, conservação, caracterização e utilização. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 2003. 43 p. (Documentos, 65).

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CASTRO, D. M. de; RODRIGUES, H. C. de A.; BEIJO, L. A.; LAMEIRA, O. A. Caracteres anatômicos de fibras foliares de brotações de curauá propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 29, n. 1, 2007.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PINTO, M. N.; **Cerrado, caracterização, ocupação e perspectiva**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1990. 654p.

REZENDE, J. C. de; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P de; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas de embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 21-26, 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, 2006.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556p.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; LIMA-BRITO, A.; PEREIRA, F. D.; NEPOMUCENO, C. F. Influence of explant polarity on morphogenesis responses of *Annona squamosa* L. cultivated *in vitro*. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**. Feira de Santana, v. 9, n. 4, p. 263-268, 2009.

SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M. de; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, 2008.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; BARBOSA, S.; PAIVA, P. D. de O.; VARGAS, D. P.; MARTINOTTO, C. Crescimento *in vitro* de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* A. St.-Hil.): influência da polaridade e luminosidade. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 19-26, 2009.

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

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

SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J.C.; RODRIGUES, A. C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob baixas concentrações e diferentes tipos de auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, 2002.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V., CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. de. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p. 1532-1538, 2003.

SOUZA, J. A. de; 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.

VALLE FIHO, G. M. Cerrado: Desenvolvimento auto-sustentável. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 3, 1991.

VICTÓRIO, C. P.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A.; LAGE, C. L. S. Sucrose on *in vitro* cultures of *Calendula officinalis* L. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 34-41, 2008.

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

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

CAPÍTULO 2 - RENDIMENTO DE EXPLANTES E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE *Anacardium othonianum* RIZZ., ORIUNDOS DE SEMENTES ARMAZENADAS POR DIFERENTES PERÍODOS

Kerley Cristina de Assis¹; Flávia Dionísio Pereira²; Silvia Correa Santos³; Fabiano Guimarães Silva⁴; Aline Ferreira da Silva⁵; Carlos César Evangelista de Menezes⁶.

¹Mestranda, Produção Vegetal, UFG; ²Dr^a. Bolsista PNP/DFINEP; ³ Prof^a. Dr^a. UFG, Campus Jataí; ⁴Dr. Professor, IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁵Estudante de IC-IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁶Dr. CTC/COMIGO.

RESUMO - O *Anacardium othonianum* Rizz. é uma espécie nativa do Cerrado e se destaca pela importância econômica para região. Sua propagação é predominantemente via sementes, no entanto, em condições naturais ou de viveiros a germinação é irregular e lenta. Inexistem trabalhos a cerca da propagação *in vitro* desta espécie. Este trabalho teve por objetivo desenvolver metodologia para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz. provenientes de sementes armazenadas por até 275 dias, formando um sistema contínuo de fornecimento de explantes para estudos *in vitro*. Sementes de *A. othonianum* Rizz. foram armazenadas durante 134, 154, 194, 209, 216 e 275 dias. Após 30 dias de semeadura, retirou-se os segmentos nodais que foram utilizados como fonte de explante. As características avaliadas foram: índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem de emergência, número médio de explantes totais coletados e tempo de coleta (dias). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos, 4 repetições. A condição de armazenamento das sementes de *A. othonianum* Rizz. por período de 134 até 275 dias, proporcionou condição satisfatória na obtenção de plantas jovens. As plantas que emergiram nas bandejas forneceram explantes suficientes para o estabelecimento *in vitro* e utilização em ensaios de micropropagação com a espécie.

Palavras-chave: emergência, espécies nativas, micropropagação

CHAPTER 2 – EXPLANT YIELD AND *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF NODAL SEGMENTS OF *Anacardium othonianum* RIZZ., ORIGINATED FROM SEEDS STORED FOR DIFFERENT PERIODS

Kerley Cristina de Assis¹; Flávia Dionísio Pereira²; Silvia Correa Santos³; Fabiano Guimarães Silva⁴; Aline Ferreira da Silva⁵; Carlos César Evangelista de Menezes⁶.

¹Graduate Student, Plant Production, UFG; ²Dr. PNP/FINEP Fellow; ³ Prof. Dr. UFG, Campus Jataí; ⁴Dr. Professor, IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁵Student IC-IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁶Dr. CTC/COMIGO.

ABSTRACT - *Anacardium othonianum* Rizz. is an economically important species native of the savannah. Its propagation is predominately by seeds; however, under natural conditions or in nurseries, germination is irregular and slow. There are no studies about *in vitro* propagation of this species. This study developed a methodology for *in vitro* establishment of *A. othonianum* Rizz. nodal segments from seeds stored for up to 275 days, forming a continuous supply system of explants for *in vitro* studies. Seeds of *A. othonianum* Rizz. were stored for 134, 154, 194, 209, 216 and 275 days. Thirty days after sowing, nodal segments were removed and used as explant sources. The characteristics evaluated were: index of emergence velocity (IVE), emergence percentage, average number of total explants collected and collection time (days). The experimental design was completely randomized with 6 treatments and 4 repetitions. The storage condition of *A. othonianum* Rizz. seeds from 134 to 275 days was sufficient to obtain Young plants. The seedlings that emerged on the trays supplied enough explants for the *in vitro* establishment and use in micro propagation trials with the species.

Keywords: emergence, native species, micropropagation

2.1 INTRODUÇÃO

A família Anacardiaceae compreende cerca de 60 a 74 gêneros e 400 a 600 espécies de árvores e arbustos. No gênero *Anacardium*, das 21 espécies descritas pela taxonomia tipológica, 18 são encontradas no Brasil (Paiva et al., 2003). As espécies do gênero são de grande potencial econômico e de importância alimentar e medicinal. Dentre essas espécies, o *Anacardium othonianum* Rizz., nativa do Cerrado, se destaca pela importância econômica para região. É bastante produtiva e a propagação é predominantemente por meio de sementes, as quais possuem fácil germinação, no entanto, em condições naturais ou viveiros normalmente é irregular e lenta (Barros, 1995; Cavalcanti Júnior & Chaves, 2001; Silva et al., 2001).

Inexistem trabalhos a cerca da propagação *in vitro* de *A. othonianum* Rizz. A espécie mais próxima que possui estudos envolvendo técnicas da cultura de tecidos é o caju (*Anacardium occidentale* L.), porém, não há protocolos eficientes para a produção massal de clones selecionados (Mashood, 2005). Para o estabelecimento *in vitro* vários são os tipos de explantes utilizados, como tecidos nucelares (Martin, 2003; Cardoza & D'Souza, 2002), sementes imaturas (Gogate & Nadgauda, 2003), cotilédones e folhas (Leva & Falcone, 1991; Sy, Martinelli & Scienza, 1991; Ananthakrishnan et al., 2002) e, segmentos nodais de plântulas ou plantas jovens (Lievens, Pylyser & Boxus, 1989).

Assim como ocorrido no caju (*Anacardium occidentale* L.) (Mashood, 2005), no o *A. othonianum* também existe uma enorme variação da forma do pseudofruto, do fruto, de sabor e de rendimento (Silva et al., 2001; Paiva et al., 2003). Dessa maneira, a utilização de explantes vegetativos como os segmentos nodais são mais apropriados para o estabelecimento *in vitro* quando comparado com explantes reprodutivos, como o estabelecimento via germinação de sementes *in vitro*, possibilitando a multiplicação de clones com a qualidade desejável.

Para estudos de regeneração *in vitro*, seja qual for o tipo de explante utilizado, é necessário o fornecimento contínuo de propágulos ao longo do ano. Considerando que essas espécies produzem frutos anualmente, existe uma enorme sazonalidade: havendo produção de muitos frutos em um ano e, poucos frutos no subsequente, o que

dificulta os estudos de propagação com essas espécies. Por tal motivo, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias que propiciem explantes durante todo ano.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz. por meio de sementes armazenadas até 275 dias, formando um sistema contínuo de fornecimento de explantes para estudos *in vitro* dessa espécie.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros de caju de árvore do cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) foram colhidos no mês de outubro de 2008. A planta matriz encontrava-se em ambiente natural, localizada na Fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás (16° 06' 20" S – 51° 17' 11" W, altitude de 592 m). Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Cerrado, do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, GO. A exsicata do material vegetal está depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí, sob o número de coleta 3793.

Realizou-se a separação dos frutos e pseudofrutos manualmente, seguido de lavagem do material propagativo em água corrente. Posteriormente, as sementes foram colocadas sobre folhas de papel toalha em temperatura ambiente para retirar a umidade superficial.

As sementes utilizadas foram tratadas com fungicida Vitavax-Thiram® [Ingrediente ativo (carboxina + tiram): 200 + 200 g/L] na dosagem de 300 mL para 100 kg de sementes.

O teor de água inicial das sementes (umidade de colheita) foi determinado pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 h, conforme RAS (Brasil, 1992). Após determinação do teor de água inicial (17%), as sementes foram submetidas à secagem rápida em contato direto com sílica gel em bandejas plásticas (35x30x8 cm) até atingir o teor de água de 13%, sendo necessários 6 dias para secagem. Após atingir a umidade

desejada, as sementes foram armazenadas em sacos plásticos em BOD a 18°C. Os tratamentos consistiram em diferentes tempos de armazenamento: 134, 154, 194, 209, 216 e 275 dias.

Após cada período de armazenamento, foram germinadas 100 sementes em bandejas plásticas (50x35x8 cm) contendo areia grossa lavada e peneirada como substrato e, mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25,61°C e umidade relativa média de 58,18%. O controle fitossanitário das plântulas foi realizado com pulverizações de solução fungicida sistêmica de Derosal® a 0,2% do produto comercial. Quinzenalmente, foram irrigadas com solução nutritiva composta pelos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Após 30 dias da sementeira, quando as plantas estavam com aproximadamente 4 cm de comprimento, segmentos nodais foram retirados destas e utilizados como fonte de explante.

Estabelecimento *in vitro*

Os segmentos nodais retirados das plantas matrizes permaneceram em recipientes com água corrente e três gotas de detergente neutro por 20 minutos. Posteriormente, os segmentos nodais foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (20%) durante 15 minutos. Finalmente, os explantes foram lavados, em câmara de fluxo laminar, por três vezes em água destilada e autoclavada.

Os segmentos nodais foram excisados com aproximadamente 2 cm e duas gemas, e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. O meio utilizado foi MS (50%) suplementado com 3% de sacarose, 2 g.L⁻¹ de carvão ativo e 30 µM de BAP (6-Benzilaminopurina). Em experimentos preliminares (dados não mostrados), observou-se que utilizando o BAP nesta concentração houve um melhor crescimento dos explantes. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,3 antes da autoclavagem. Os tubos inoculados foram mantidos no escuro em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3°C, durante 30 dias.

Após o período de escuro os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico ao que lhe deu origem, e foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por mais 30 dias.

As características avaliadas foram: índice de velocidade de emergência (IVE), porcentagem de emergência, tempo de coleta (dias) e número médio de explantes totais coletados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos (134, 154, 194, 209, 216 e 275 dias de armazenamento) e quatro repetições, cada uma formada por 100 sementes. Os dados de porcentagem de emergência e índice de velocidade de emergência foram avaliados estatisticamente, mediante análise de variância com aplicação do teste F a 5% de probabilidade e as médias, analisadas por regressão linear com auxílio do software R (Development Core Team, 2009). Para análise das características tempo de coleta (dias) e número médio de explantes totais coletados, foi utilizado a estatística descritiva com médias e erro padrão.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início da emergência foi verificado entre 13 e 15 dias após a semeadura em todos os tempos de armazenamento. As plantas emergidas a partir das sementes eram normais e vigorosas (Figura 2.1) conforme RAS (Brasil, 1992).

O modelo linear foi o mais adequado para explicar a queda da porcentagem de emergência e o índice de velocidade de emergência (IVE). À medida que aumentou o tempo de armazenamento das sementes, houve redução da porcentagem e velocidade de emergência (Figura 2.2 e 2.3).

A porcentagem de emergência foi de 42,50% em sementes armazenadas por 134 dias e de 26,25% para o armazenamento até 275 dias (Figura 2.2). O IVE foi de 1,72 aos 134 dias, chegando a 1,03 para os 275 dias (Figura 2.3). Independentemente do processo de armazenamento, mesmo considerando as condições ótimas de teor de

água e de temperatura, em todas as sementes ocorre o processo contínuo de deterioração, levando à perda gradativa da viabilidade e do vigor (Martins et al., 2009).

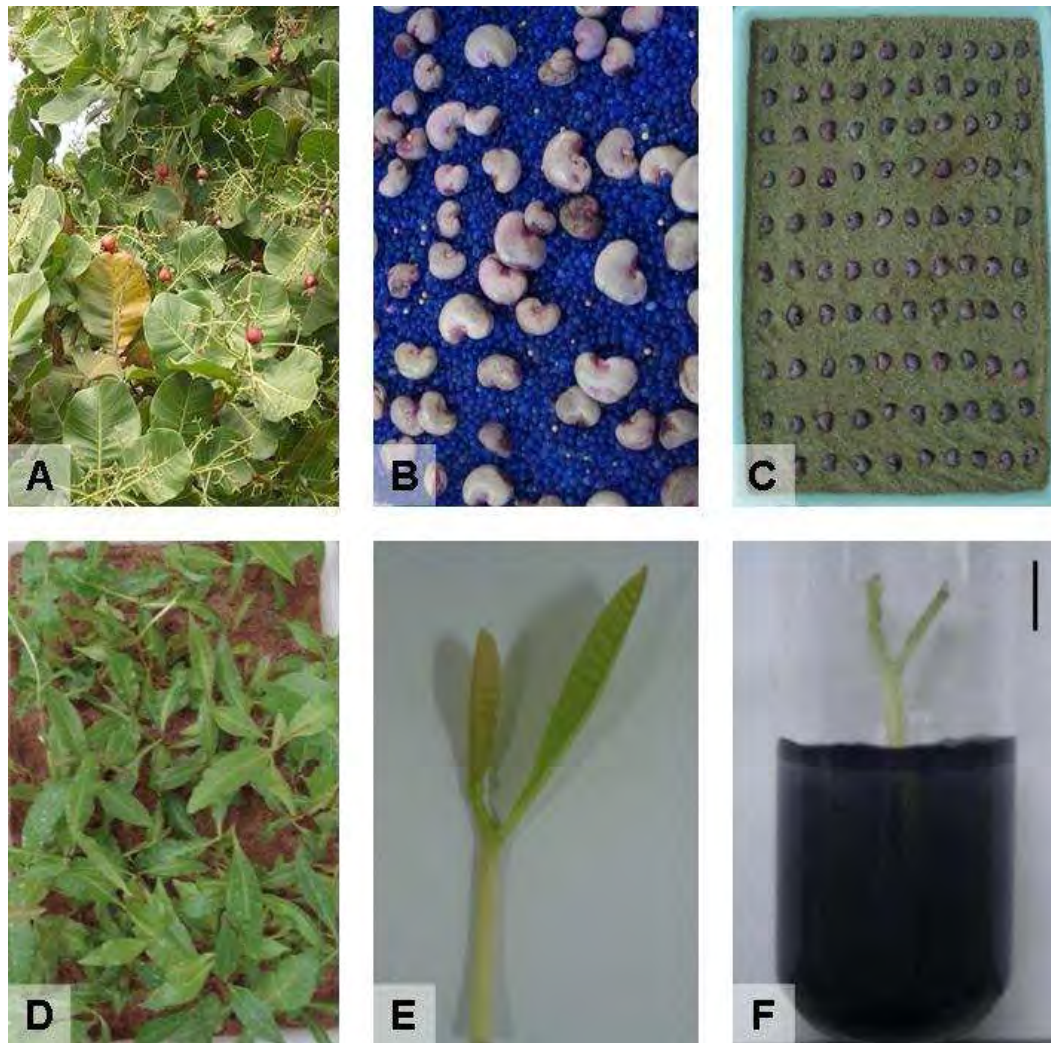
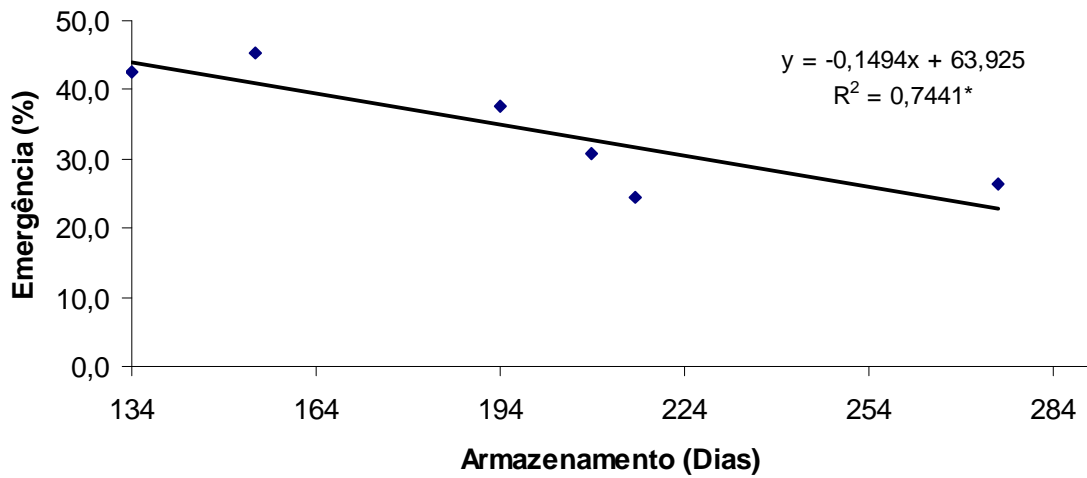
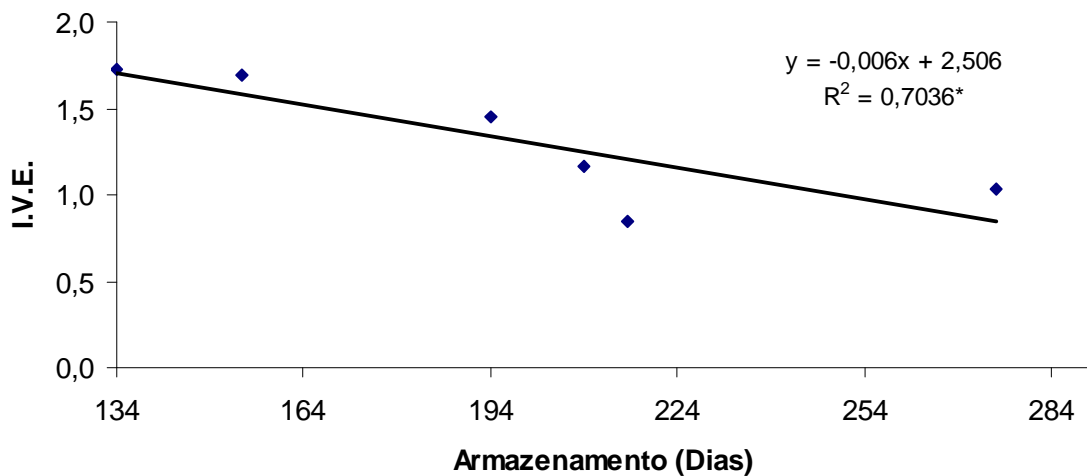


Figura 2.1. Planta matriz de *A. othonianum* Rizz. com frutos (A); secagem de sementes em sílica gel (B); sementes semeadas em bandejas (C); plantas germinadas em bandejas (D); ápices retirados de plantas germinadas em bandejas (E); segmento nodal estabelecido *in vitro* (F). Rio Verde-GO, 2009. Barra= 10mm



* 5% de probabilidade.

Figura 2.2. Porcentagem de emergência de plantas de *A. othonianum* Rizz. em função do tempo de armazenamento. Rio Verde-GO, 2009.



* 5% de probabilidade.

Figura 2.3. Índice de velocidade de emergência de plantas de *A. othonianum* Rizz. em função do tempo de armazenamento. Rio Verde-GO, 2009.

O tempo máximo em que as plantas de *A. othonianum* Rizz. permaneceram viáveis fornecendo explantes foi de até 57 dias, em plantas provenientes de sementes

armazenadas por 154 dias. O tempo mínimo observado foi de 14 dias em plantas provenientes de sementes armazenadas por 216 dias. O número total de explantes por coleta foi de 68,2 em média, quando as sementes foram armazenadas por 134 dias. Conforme elevou o período de armazenamento das sementes, foi notada uma redução considerável chegando a 20,8 explantes coletados em média em plantas provenientes de sementes armazenadas por 216 dias (Tabela 2.1).

O tempo de coleta (dias), o qual variou conforme o período de armazenamento das sementes, foi determinado pela vida útil das plantas que emergiram nas bandejas, após alguns dias coletando explantes, pois iniciavam sintomas de morte, semelhante a um apodrecimento, com coloração marrom. Uma vez que os primeiros sintomas apareciam em alguma planta, gradativamente eles se espalhavam para as demais da mesma bandeja. Dessa forma, quando o sintoma era observado em todas as plantas da bandeja, essas eram descartadas. Nos diferentes tempos de armazenamento das sementes, não foram observadas diferenças nos sintomas de morte das plantas e não foram investigados os fatores que ocasionaram a morte das mesmas.

Tabela 2.1. Tempo de coleta e número de explantes totais coletados em diferentes tempos de armazenamento das sementes de *A. othonianum* Rizz. Rio Verde, GO. 2009.

Tempo de Armazenamento das sementes (dias)	Tempo de coleta (dias)	Número total de explantes coletados
134	40,8 ± 1,97*	68,2 ± 5,48
154	57,0 ± 0,00	52,5 ± 7,51
194	17,0 ± 1,00	48,8 ± 1,33
209	37,3 ± 1,87	48,5 ± 1,20
216	14,0 ± 3,30	20,8 ± 5,20
275	22,0 ± 0,00	29,8 ± 2,93

*Médias ± Erro padrão da média.

Estabelecimento *in vitro*

Não foi observado oxidação, escurecimento e subsequentes necroses dos explantes estabelecidos, ao contrário dos vários relatos para a espécie *A. occidentale* L.

(Das, Jha & Jha, 1996; Boggetti, Jasik & Mantell, 1999). Esta ausência de liberação de compostos fenólicos pode ser atribuída ao fato das plantas fornecedoras dos explantes serem jovens e ao fato dos segmentos nodais terem sido mantidos em ausência de luz nos primeiros 30 dias de cultivo *in vitro* e em meio com carvão ativado.

Por meio de observações visuais não foi notado quantidade significativa de explantes contaminados, desta forma, pode-se afirmar que as pulverizações com fungicida nas plantas fornecedoras de explantes, a desinfestação antes da inoculação e os cuidados na transferência para cultivo *in vitro* foram condições satisfatórias para o controle da contaminação.

Verificou-se que, embora neste trabalho foram utilizados segmentos nodais provenientes de plantas jovens, a metodologia utilizada com o armazenamento das sementes e o plantio nas bandejas com posterior emergência das plantas foi eficiente em fornecer explantes viáveis para a implantação *in vitro* da espécie em estudo.

2.4 CONCLUSÕES

A condição de armazenamento das sementes de *A. othonianum* Rizz. por período de 134 até 275 dias proporcionou condição satisfatória na obtenção de plantas jovens.

As plantas que emergiram nas bandejas forneceram explantes suficientes para o estabelecimento *in vitro* e utilização em ensaios de micropropagação com a espécie.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTHAKRISHNAN, G.; RAVIKUMAR, R.; GIRIJA, S.; GANAPATHI, A. *In vitro* adventitious shoot explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 93, 2002.

BARROS, L. M. Botânica, Origem e Distribuição Geográfica. In: Araújo, J. P. P. e Silva, V. V. **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção**. EMBRAPA-CNPAT, Fortaleza, 1995. p. 53-69.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e Reforma Agrária**. Regras para análise de sementes. Brasília, 1992.

BOGGETTI, B.; JASIK, J.; MANTELL, S. *In vitro* multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glashouse-raised plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 456-461, 1999.

CARDOZA, V. D'SOUZA, L. Induction, development and germination of somatic embryos from nucellar tissues of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 93, 2002.

CAVALCANTI JÚNIOR, A. T.; CHAVES, J. C. M. **Produção de mudas de cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 43 p. (Documento 42).

DAS, S.; JHA, T. B.; JHA, S. *In vitro* propagation of cashewnut. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15 (8), 1996.

GOGATE, S. S.; NADGAUDA, R. S. Direct induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of cashewnut (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 97, 2003.

LEVA, A.R., FALCONE, A.M. Propagation and organogenesis *in vitro* of (*Anacardium occidentale* L.). **Acta Horticulturae**, Hague, 289, 1991.

LIEVENS, C., PYLYSER, M., BOXUS, P. First results about micropropagation of *Anacardium occidentale* by tissue culture. **Fruits**, Paris, v. 44, n. 10, p. 553-557, 1989.

MARTIN, K.P. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on seed coat explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, 2003.

MARTINS, L.; LAGO, A. A. do; ANDRADE, A. C. S. de. Armazenamento de sementes de ipê-branco: teor de água e temperatura do ambiente. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, 2009.

MASHOOD, A. O. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 4 (13), 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 5, p. 473-497, 1962.

PAIVA, J. R.; CRISOSTOMO, J. R.; BARROS, L. M. **Recursos Genéticos do cajueiro: coleta, conservação, caracterização e utilização**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 2003. 43 p. (Documentos, 65).

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2009.

SILVA, D.B. da; SILVA, J.A.da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.de. Frutas do cerrado. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológica**, 2001.179p.

SY, M.O., MARTINELLI, L., SCIENZA, A. *In vitro* organogenesis and regeneration in cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Acta Horticulturae**, Hague, v. 289, 1991.

CAPÍTULO 3 – CULTIVO *IN VITRO* DE *Anacardium othonianum* RIZZ.: I INFLUÊNCIA DOS SAIS E VOLUMES DO MEIO DE CULTURA

Kerley Cristina de Assis¹; Flávia Dionísio Pereira²; Juliana Silva Rodrigues Cabral³; Fabiano Guimarães Silva⁴; José Waldemar Silva⁵; Carlos César Evangelista de Menezes⁶.
¹Mestranda, Produção Vegetal, UFG; ²Dr^a., Bolsista PNPd/FINEP; ³Estudante de IC-IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁴Dr. Professor IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁵Dr. Professor, UFU/Uberlândia-MG; ⁶Dr. CTC/COMIGO.

RESUMO – O *Anacardium othonianum* Rizz. é uma espécie frutífera e medicinal nativa do Cerrado brasileiro. As plantas adultas distinguem-se das demais espécies do gênero existente nesse bioma em função do seu porte arbóreo. Sua exploração ocorre de forma extrativista e muitas vezes em caráter predatório. Sob esse contexto, a micropropagação tem dado significativas contribuições na propagação e preservação de caracteres de interesse em diversas espécies de plantas e, desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sais e volumes do meio de cultura no cultivo *in vitro* de *A. othonianum* Rizz. No ensaio (I), testou-se dois meios de cultura (MS e WPM) e três concentrações de sais (100, 50 e 25%) dispostos em delineamento inteiramente casualizado. No ensaio (II), testou-se dois meios de cultura MS (50%) e WPM (100%) e cinco volumes de meio (10, 15, 20, 25 e 30 mL por tubo de ensaio) utilizando delineamento inteiramente casualizado, conduzido em arranjo fatorial 2 x 5. Após 30 e 60 dias de cultivo avaliou-se: porcentagem de sobrevivência de plântulas, comprimento médio de plântulas e folhas e, número médio de folhas e gemas por explante. Concluiu-se que os meios MS (50 e 25%) e WPM (100 e 50%) foram os mais eficientes na regeneração de plântulas. Foram observadas as melhores respostas no meio MS (50%) com volumes de 15 e 25 mL, desta forma sugere-se a utilização do volume de 15 mL visando maior economia.

Palavras-chave: caju, cultura de tecidos, propagação *in vitro*

CHAPTER 3 – *IN VITRO* CULTIVATION OF *Anacardium othonianum* RIZZ.: I EFFECT OF SALTS AND VOLUME OF THE CULTURE MEDIUM

Kerley Cristina de Assis¹; Flávia Dionísio Pereira²; Juliana Silva Rodrigues Cabral³; Fabiano Guimarães Silva⁴; José Waldemar Silva⁵; Carlos César Evangelista de Menezes⁶.
¹Graduate Student, Plant Production, UFG; ²Dr^a., PNP/FINEP Fellow; ³Student of IC-IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁴Dr. Professor IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁵Dr. Professor, UFU/Uberlândia-MG; ⁶Dr. CTC/COMIGO.

ABSTRACT – *Anacardium othonianum* Rizz. is a fruiting and medicinal species native of the Brazilian savannah. Adult plants are different from the other species in the genus in this ecosystem due to its size. Its exploration is extractivist and oftentimes predatory. In this context, micro propagation has significantly contributed for the propagation and preservation of characters of interest in several plant species; therefore, this study evaluated the effect of different salt concentrations and volumes in the culture medium for *in vitro* cultivation of *A. othonianum* Rizz. Trial (I), evaluated two culture media (MS and WPM) and three salt concentrations (100, 50 and 25%) in a completely randomized design. Trial (II), evaluated two culture media MS (50%) and WPM (100%) and Five medium volumes (10, 15, 20, 25 and 30 mL per test tube) in a completely randomized design, as a 2 x 5 factorial. After 30 and 60 days of growth, the percentage survival of plantlets, average length of plantlets and leaves and the average number of leaves and buds per explant were evaluated. It was concluded that the media MS (50 and 25%) and WPM (100 and 50%) were the most effect for plantlet regeneration. The best responses were observed in the medium MS (50%) with volumes of 15 and 25 mL. Therefore, the use of 15 mL volume is suggested for the greater economy of medium.

Keywords: cashew, tissue culture, *in vitro* propagation.

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética de espécies frutíferas nativas, sendo um setor agrícola de grande importância para o país, desempenhando relevante papel econômico, social e alimentar (Bastos, 2007).

O *Anacardium othonianum* Rizz. é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, conhecido popularmente como caju de árvore do cerrado. As plantas adultas distinguem-se das demais espécies do gênero existentes no bioma em função do seu porte arbóreo. A altura das plantas e o diâmetro da copa variam de 3 a 4 metros. O pseudofruto tem forma de pêra e a coloração pode variar do amarelo ao vermelho; internamente, os pseudofrutos possuem coloração branco-amarelada. É uma espécie de grande relevância para região em que se encontra por possuir propriedades medicinais e amplo aproveitamento alimentar. No entanto, sua exploração geralmente é de caráter extrativista e muitas vezes de forma predatória (Silva et al., 2001).

A micropropagação tem dado significativas contribuições na propagação e na preservação de caracteres de interesse em diversas espécies de plantas. Embora esse processo envolva diferentes etapas, após a definição de um protocolo de micropropagação de uma determinada espécie, pode ser otimizado, objetivando a obtenção de plantas com alta qualidade e baixo custo de produção. Em trabalhos de micropropagação envolvendo uma espécie pouco estudada, um fator a ser investigado é o meio de cultura a ser utilizado. Os meios de cultura, além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Torres et al., 2001).

Uma grande variedade de meios de cultura tem sido utilizada para a regeneração de espécies de diferentes gêneros. Alguns desses meios foram especificamente desenvolvidos para fornecer os requisitos particulares à espécie estudada, como o meio básico de cultura (MS) de Murashige & Skoog (1962) desenvolvido inicialmente para tecido medular de *Nicotiana tabacum* e, o Woody Plant Medium (WPM), elaborado por Lloyd & Mccown (1980), atendendo melhor, em alguns casos, a propagação de plantas lenhosas.

Considerando-se a necessidade da realização de estudos básicos de micropropagação com *A. othonianum* Rizz., como forma de preservação da espécie e clonagem de genótipos superiores, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sais e volumes de meios de cultura no cultivo *in vitro* da espécie.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal utilizado na propagação *in vitro* foi retirado de frutos de *A. othonianum* Rizz. coletados em outubro de 2008, na fazenda Gameleira, localizada no município de Montes Claros, GO, com as coordenadas geográficas 16° 06' 20" S – 51° 17' 11" W a 592 m de altitude. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás - Campus de Jataí, sob o número de coleta 3793. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Cerrado, do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, GO.

A despolpa dos frutos foi realizada manualmente seguido de lavagem do material em água corrente. A umidade superficial das sementes foi retirada sobre folhas de papel toalha em temperatura ambiente. Realizou-se, em seguida, a seleção manual e o descarte das sementes malformadas. As sementes utilizadas foram tratadas com fungicida Vitavax-Thiram® [Ingrediente Ativo (carboxina + tiram): 200 + 200 g/L] na dosagem de 300 mL para 100 kg de sementes. Após o tratamento, foram desidratadas em contato direto com sílica gel em bandejas plásticas (35x30x8 cm) até atingir o teor de água de 13%. Posteriormente foram embaladas em saco plástico e armazenadas em BOD sob temperatura de 18 graus.

As sementes armazenadas foram germinadas em porções de 100 em bandejas plásticas (50x35x8 cm), contendo areia lavada como substrato. As bandejas foram mantidas em ambiente controlado com temperatura média de 25,61°C e umidade relativa de 58,18%. O controle fitossanitário foi feito com pulverizações de solução do fungicida sistêmico de Derosal® a 0,2% do produto comercial, com 24 horas antes da

coleta dos explantes. Quinzenalmente foram feitas regas com solução nutritiva composta pelos sais nutritivos do meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Após 30 dias da semeadura, quando as plantas estavam com aproximadamente 4 cm de comprimento, os segmentos nodais foram retirados e utilizados como fonte de explante.

Estabelecimento *in vitro*

Retirou-se segmentos nodais de plantas matrizes e esses foram submersos em recipientes com água corrente contendo três gotas de detergente neutro durante 20 minutos. Em seguida, foram imersos por 30 segundos em álcool 70% (v/v) e 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio (20%). A tríplice lavagem foi feita em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada.

O meio utilizado no estabelecimento foi MS (50%) solidificado com 4 g.L⁻¹ de ágar, suplementado com 3% de sacarose, 2 g.L⁻¹ de carvão ativo e 30 µM de BAP (6-Benzilaminopurina). Em experimentos preliminares (dados não mostrados), observou-se que utilizando o BAP nesta concentração havia um melhor crescimento dos explantes. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,3 antes da autoclavagem. Os segmentos nodais foram excisados com aproximadamente 2 cm e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Os tubos inoculados foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 3°C, durante 30 dias. Após o período de escuro, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo idêntico ao que lhes deu origem e, foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de 25 ± 3°C, radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m⁻² s⁻¹ por mais 30 dias.

Procedidos 60 dias de cultivo *in vitro* foram feitas as avaliações de crescimento descritas nos Ensaio I e II.

Ensaio (I) Avaliações das concentrações dos meios de cultivo na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.

Segmentos nodais, com aproximadamente 2 cm de comprimento, contendo duas gemas foram utilizados como fonte de explantes. Estes segmentos foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio de cultivo que diferenciavam no tipo e nas concentrações utilizadas. Os meios de cultura utilizados foram MS e WPM (Lloyd & Mccown 1980) e em ambos testou-se as concentrações de (100, 50 e 25%). Os meios foram solidificados e suplementados com 2 g.L⁻¹ de carvão ativo, 30 µM de BAP e o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,3 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de 25 ± 3°C e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m⁻² s⁻¹.

Aos 30 dias avaliou-se a porcentagem de sobrevivência, o número médio de gemas, o número e o comprimento médio de folhas e plântulas. As plântulas obtidas durante este período foram analisadas, excisadas e inoculadas para o mesmo meio que lhes deram origem. Transcorridos mais 30 dias de subcultivo novas avaliações foram efetuadas por meio das mesmas características. Portanto, as avaliações foram feitas com 30 e 60 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 6 tratamentos e 25 repetições, cada repetição constituída por um tubo, totalizando 150 unidades experimentais em cada subcultivo (30 e 60 dias). Os dados numéricos de gemas e de folhas foram submetidos à análise de variância utilizando o software R (Development Core Team, 2009), sendo as médias comparadas por meio de contrastes por modelos lineares não generalizados. Já o comprimento médio de plântulas e de folhas e a porcentagem de sobrevivência foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2003).

Ensaio (II) Avaliação do volume dos meios de cultivo na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.

De acordo com os resultados obtidos no Ensaio (I), selecionou-se dois dos meios de cultura que tiveram melhores respostas. O pH dos meios foi ajustado para $5,7 \pm 0,3$ antes da autoclavagem. Em ambos os meios, foram testados 5 volumes do meio de cultura: 10, 15, 20, 25 e 30 mL.

Como fonte de explante foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 2 cm de comprimento e contendo duas gemas. Esses segmentos foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm). As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Aos 30 dias de cultivo foram avaliados, percentual de sobrevivência, o número médio de gemas, o número e o comprimento médio de folhas e plântulas. As plântulas obtidas durante este período foram avaliadas, excisadas e inoculadas para o mesmo meio que lhes deram origem. Decorridos mais 30 dias, novas avaliações foram efetuadas por meio das mesmas características. Portanto, as avaliações foram realizadas com 30 e 60 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 2×5 (meio de cultivo x volumes dos meios) e cada tratamento continha 25 repetições, cada qual constituída por um tubo, totalizando 250 unidades experimentais em cada subcultivo. Os dados numéricos de gemas e de folhas foram submetidos à análise de variância utilizando o software R (Development Core Team, 2009), sendo as médias comparadas por meio de contrastes por modelos lineares não generalizados. Já os comprimentos médios das plântulas e das folhas, e a sobrevivência de plântulas foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2003).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio (I) Avaliações das concentrações dos meios de cultivo na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.

Por meio de observações visuais, aos 30 dias de cultivo, verificou-se que os segmentos nodais cultivados em meio MS (100%) regeneraram em plântulas pouco vigorosas e com coloração amarelada. Os demais segmentos nodais regeneraram em plântulas bem formadas e cor verde escura. Não foram observadas oxidações e formações de raízes e calos. Constatou-se pelo teste de Scott Knott que o meio MS (100%) diferiu dos demais meios de cultura com 84% de sobrevivência de plântulas (Tabela 3.1).

Nas avaliações realizadas aos 30 dias, foram verificadas diferenças para o comprimento de plântulas e de folhas (Figura 3.1). Os tratamentos onde se utilizou os meios MS (50 e 25%) e WPM (100 e 50%) foram os que tiveram maior crescimento, com comprimentos de 3,17 a 3,72 cm, respectivamente. Para o comprimento de folhas, os meios MS (50 e 25%) e WPM (100%) obtiveram comprimentos de 0,97; 1,00 e 0,88 cm, respectivamente.

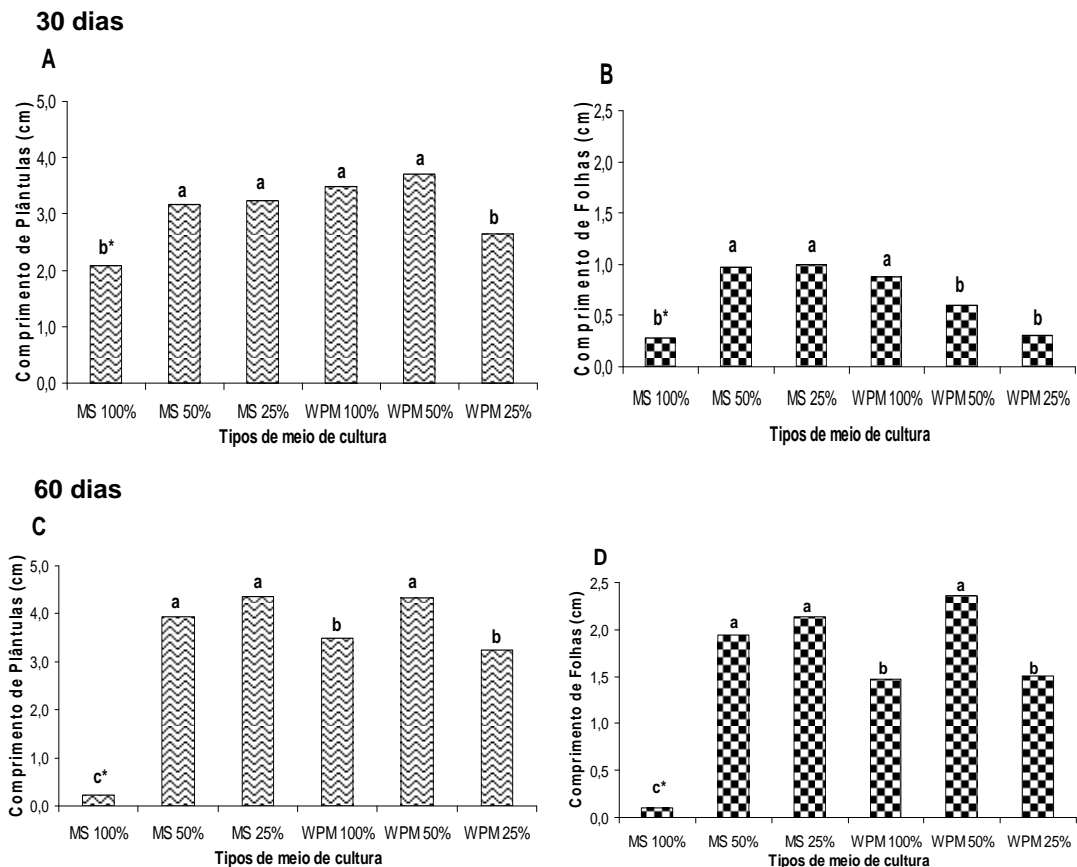
Aos 60 dias de cultivo, observou-se que a maior parte das plântulas cultivadas no meio MS (100%) ficou desidratada e posteriormente houve morte de parte das mesmas. A porcentagem de sobrevivência foi de apenas 12%, diferindo dos demais meios de cultura utilizados (Tabela 3.1).

Foi constatado diferenças nas avaliações feitas aos 60 dias de cultivo (Figura 3.1 e 3.2). Os meios MS (50 e 25%) e WPM (50%) obtiveram as maiores médias tanto para o comprimento de plântulas (3,94; 4,36 e 4,34 cm, respectivamente) quanto para o comprimento de folhas (1,94; 2,13 e 2,36 cm, respectivamente).

Tabela 3.1. Percentual de sobrevivência de plântulas de *A. othonianum* Rizz. aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações do meio MS e WPM. Rio Verde, GO, 2009.

MEIOS DE CULTURA	Sobrevivência de plântulas (%)	
	30 Dias	60 Dias
MS-100%	84 B*	12 B
MS-50%	100 A	96 A
MS-25%	100 A	100 A
WPM-100%	100 A	100 A
WPM-50%	100 A	100 A
WPM-25%	100 A	100 A

*Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.



*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

Figura 3.1. Comprimento médio de plântulas (**A e C**), comprimento médio de folhas (**B e D**) de *A. othonianum* Rizz., respectivamente aos 30 e 60 dias; em diferentes concentrações dos meios MS e WPM. Rio Verde, GO, 2009.

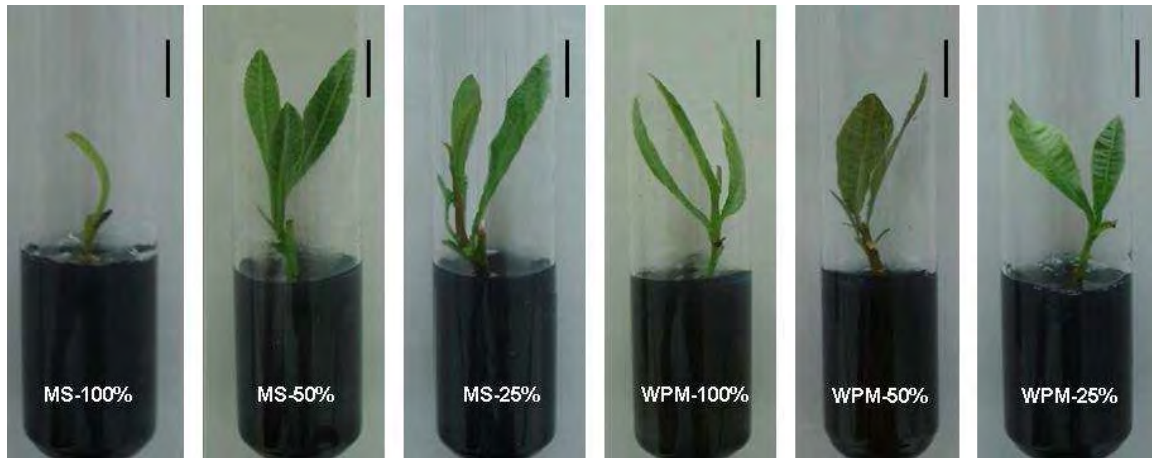


Figura 3.2. Plântulas de *A. othonianum* Rizz., aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações dos meios MS e WPM. Rio Verde, GO. 2009. Barra= 10mm.

Pela análise de contraste, verificou-se efeito significativo para o número de folhas na avaliação aos 30 dias (Tabela 3.2). O efeito dos meios MS (50 e 25%) e WPM (100 e 50%) foi superior quando comparado com o efeito dos demais meios de cultivo. Não foi observado formação de novas gemas.

Na avaliação realizada aos 60 dias, pela análise de contrastes, detectou-se que houve diferenças significativas para o número de folhas e gemas (Tabela 3.2). Nas duas características em questão, observou-se efeito superior do meio WPM quando comparado com MS, nas três concentrações testadas. Ainda, para as duas características avaliadas o efeito dos meios MS (50 e 25%) foi superior ao meio MS (100%). Já o meio WPM (100%) teve efeito significativo apenas para número de folhas.

Tabela 3.2. Análise de contrastes entre os tratamentos para número médio de folhas e gemas de *A. othonianum* Rizz., aos 30 e 60 dias de cultivo, em diferentes concentrações dos meios MS e WPM. Rio Verde, GO, 2009.

30 dias de cultivo			
Contrastes	Estimativa	Erro Padrão	Pr (> z)
	Número de folhas		
MS-100+MS-50+MS-25 vs WPM-100+WPM-50+WPM-25	0,16	0,18	0,37 ^{n.s}
MS-100 vs MS-50+MS-25	-2,08	0,62	0,00 *
WPM-100 vs WPM-50+WPM-25	1,26	0,52	0,01 *
MS-50 vs MS-25	0,00	0,24	1,00 ^{n.s}
WPM-50 vs WPM-25	1,20	0,38	0,00 *
60 dias de cultivo			
Contrastes	Estimativa	Erro Padrão	Pr (> z)
	Número de folhas		
MS-100+MS-50+MS-25 vs WPM-100+WPM-50+WPM-25	-0,82	0,26	0,00 *
MS-100 vs MS-50+MS-25	-2,99	0,71	0,00 *
WPM-100 vs WPM-50+WPM-25	0,41	0,20	0,04 *
MS-50 vs MS-25	-0,20	0,22	0,37 ^{n.s}
WPM-50 vs WPM-25	0,47	0,26	0,07 ^{n.s}
Número de gemas			
MS-100+MS-50+MS-25 vs WPM-100+WPM-50+WPM-25	-1,07	0,39	0,00 *
MS-100 vs MS-50+MS-25	-2,29	1,02	0,02 *
WPM-100 vs WPM-50+WPM-25	-0,18	0,34	0,59 ^{n.s}
MS-50 vs MS-25	-0,20	0,44	0,65 ^{n.s}
WPM-50 vs WPM-25	-0,20	0,37	0,57 ^{n.s}

*significativo a 5% de probabilidade; ^{NS} não significativo.

Observou-se no Ensaio (I), que o meio MS (100%) foi o menos eficiente em todas as características avaliadas. É importante ressaltar que o meio MS possui alta concentração de sais em sua composição quando comparado aos outros meios de cultura. Dessa forma, o efeito negativo causado pela composição original foi inadequada ao processo de regeneração dos segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.

Entretanto, vários autores observaram que para espécie *A. occidentalle* L. as melhores respostas na regeneração e crescimento *in vitro* foram obtidas utilizando meio MS (100%) (Das et al., 1996; Mneney & Mantell, 2001; Ananthakrishnan et al., 2002; Aliyu & Awopetu, 2005).

Em geral, para espécies lenhosas, a redução dos sais é benéfica para o crescimento das culturas. Este fato foi observado no Ensaio (I), reduzindo a concentração dos sais do meio MS ou com a utilização do meio WPM; no entanto, a concentração do meio WPM (25%) não foi suficiente para suprir as necessidades das plântulas de maneira a promover crescimento satisfatório das mesmas. Alguns autores constataram que a redução dos sais do meio de cultivo favoreceu o crescimento das culturas *in vitro* (Thymmappaiah et al., 2002; Lédo et al., 2007; Radmann et al., 2009a; Radmann et al., 2009b).

Dessa forma, verificou-se no Ensaio (I) que os meios MS (50 e 25%) e WPM (100 e 50%) foram os mais eficientes na regeneração e crescimento dos segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.

Ensaio (II) Avaliação do volume dos meios de cultivo na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.

Portanto, no ensaio (II) testou-se: 1) meio MS (50%) sólido suplementado com 2 g.L⁻¹ de carvão ativo e 30 µM de BAP; 2) meio WPM (100%) sólido com 2 g.L⁻¹ de carvão ativo e 30 µM de BAP.

Nas avaliações realizadas, a interação foi significativa para os meios x volumes apenas para a variável comprimento médio de folhas, quando os segmentos nodais foram cultivados até 30 dias (Tabela 3.3). Verificou-se que no meio MS, os volumes de 15, 20 e 25 mL promoveram o maior crescimento das folhas (3,03; 3,29 e 3,17 cm, respectivamente) em comparação com os volumes de 10 e 30 mL (2,19 e 2,54 cm, respectivamente). No volume de 10 mL, observou-se que o meio WPM promoveu aumento significativo no comprimento das folhas atingindo 3,46 cm; já para o meio MS a média foi de 2,19 cm (Tabela 3.3).

O efeito isolado dos meios de cultura não foi significativo para o comprimento de plântulas e folhas aos 30 dias (Tabela 3.3). No comprimento de plântulas obteve-se média de 4,70 cm para o meio MS e 4,50 cm para o WPM. Quanto ao comprimento de folhas, as médias foram de 2,85 cm para o MS e 2,89 cm para o WPM.

Nas avaliações feitas aos 60 dias, observaram-se diferenças apenas para o comprimento de plântulas, tendo o meio MS proporcionado maior crescimento: média de 5,46 cm quando comparado com o meio WPM, 4,69 cm.

Considerando o efeito isolado dos volumes testados, aos 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças tanto para característica comprimento de plântulas quanto de folhas (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Comprimento médio de plântulas e de folhas de *A. othonianum* Rizz., aos 30 e 60 dias de cultivo, em diferentes volumes dos meios de cultura. Rio Verde, GO, 2009.

30 dias de cultivo							
Variável (cm)	Meios	Volumes (mL)					Médias
		10	15	20	25	30	
Comprimento de plântulas	MS	4,18*	5,22	4,98	5,02	4,12	4,70 a
	WPM	4,80	4,60	4,54	4,44	4,16	4,50 a
Médias		4,49 A	4,91 A	4,76 A	4,73 A	4,14 A	
Comprimento de folhas	MS	2,19 b B	3,03 a A	3,29 a A	3,17 a A	2,54 a B	2,85 a
	WPM	3,46 a A	2,91 a A	2,67 a A	2,83 a A	2,57 a A	2,89 a
Médias		2,83 A	2,97 A	2,98 A	3,00 A	2,55 A	
60 dias de cultivo							
Variável (cm)	Meios	Volumes (mL)					Médias
		10	15	20	25	30	
Comprimento de plântulas	MS	4,90	6,16	5,68	5,64	4,94	5,46 a
	WPM	5,14	4,92	5,10	4,36	3,96	4,69 b
Médias		5,02 A	5,54 A	5,39 A	5,00 A	4,45 A	
Comprimento de folhas	MS	2,72	3,48	3,26	3,08	2,70	3,05 a
	WPM	3,05	3,02	2,95	2,67	2,33	2,81 a
Médias		2,89 A	3,25 A	3,10 A	2,87 A	2,52 A	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, e pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Pela análise de contraste entre os tratamentos (Tabela 3.4) verificou-se efeito significativo na avaliação feita aos 30 dias, quando contrastado os meios de cultivo em cada volume. O efeito do meio MS com volume de 30 mL foi superior para característica número de folhas. Quanto ao número de gemas, o efeito do meio MS foi superior com volumes de 10, 15 e 25 mL. Os demais contrastes não foram significativos aos 30 dias de cultivo.

Nas avaliações realizadas aos 60 dias, houve efeito significativo quando contrastados os meios de cultivo em cada volume. O meio MS com volumes de 15, 25 e 30 mL foi superior para característica número de folhas. Já para o número de gemas, o MS com volumes de 10, 15 e 25 mL foi superior. Os demais contrastes testados não foram significativos (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Análise de contrastes entre os tratamentos para o número de folhas e gemas de *A. othonianum* Rizz., aos 30 e 60 dias de cultivo, em diferentes volumes dos meios de cultura. Rio Verde-GO, 2009.

30 dias de cultivo				
Contraste Fixado	Contrastes	Estimativa	Erro Padrão	Pr(> z)
Número de folhas				
Volumes (mL)	MS-10 vs WPM-10	0,22	0,24	0,34 ^{n.s}
	MS-15 vs WPM-15	0,36	0,23	0,13 ^{n.s}
	MS-20 vs WPM-20	0,08	0,24	0,71 ^{n.s}
	MS-25 vs WPM-25	0,33	0,26	0,19 ^{n.s}
	MS-30 vs WPM-30	0,55	0,25	0,02 [*]
Número de gemas				
Volumes (mL)	MS-10 vs WPM-10	1,38	0,55	0,01 [*]
	MS-15 vs WPM-15	1,16	0,51	0,02 [*]
	MS-20 vs WPM-20	0,53	0,47	0,25 ^{n.s}
	MS-25 vs WPM-25	1,87	0,75	0,01 [*]
	MS-30 vs WPM-30	0,69	0,46	0,13 ^{n.s}
60 dias de cultivo				
Contraste Fixado	Contrastes	Estimativa	Erro Padrão	Pr(> z)
Número de folhas				
Volumes (mL)	MS-10 vs WPM-10	0,24	0,18	0,19 ^{n.s}
	MS-15 vs WPM-15	0,45	0,19	0,01 [*]
	MS-20 vs WPM-20	0,16	0,18	0,36 ^{n.s}
	MS-25 vs WPM-25	0,53	0,19	0,00 [*]
	MS-30 vs WPM-30	0,72	0,21	0,00 [*]
Número de gemas				
Volumes (mL)	MS-10 vs WPM-10	1,84	0,62	0,00 [*]
	MS-15 vs WPM-15	2,14	0,74	0,00 [*]
	MS-20 vs WPM-20	0,40	0,52	0,44 ^{n.s}
	MS-25 vs WPM-25	2,19	1,05	0,03 [*]
	MS-30 vs WPM-30	0,31	0,46	0,49 ^{n.s}

*significativo a 5% de probabilidade; ^{NS} não significativo

Por meio de observações visuais verificou-se que em ambos os meios de cultivo e em todos os volumes testados, os segmentos nodais formaram plântulas vigorosas, sem formação de calos e não foi observado a formação de raízes (Figura 3.3).

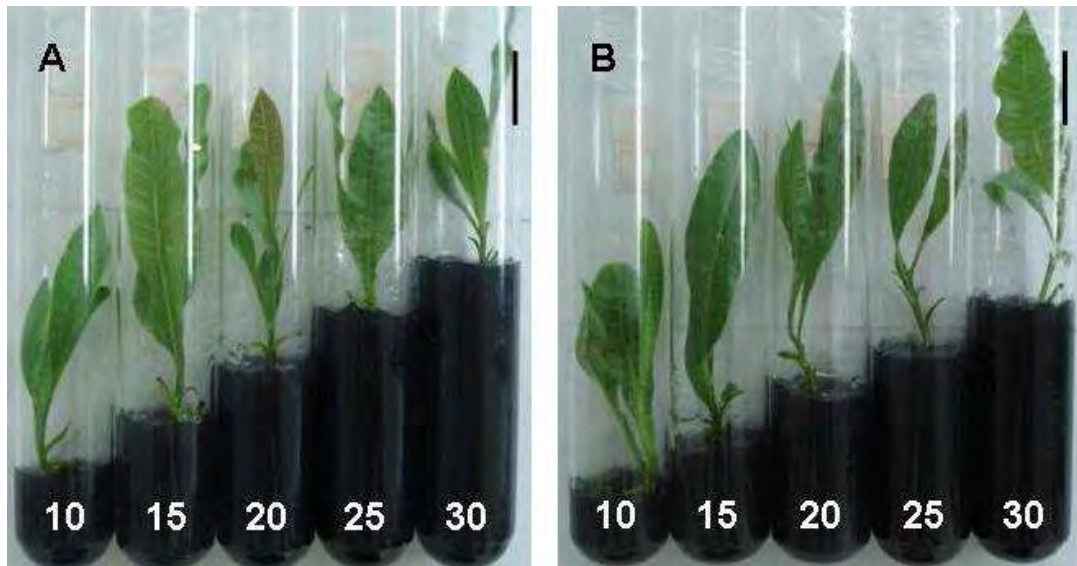


Figura 3.3. Plântulas de *A. othonianum* Rizz., aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Meio MS 50% com diferentes volumes (mL) (A); Meio WPM com diferentes volumes (mL) (B). Rio Verde, GO. 2009. Barra= 10mm.

O espaço interno do recipiente disponível para o crescimento dos explantes exerce grande influência no cultivo *in vitro* das espécies. Esse espaço interno varia em função do formato e do volume do recipiente, além do volume do meio de cultura utilizado. Essas variáveis são pouco estudadas, embora exerçam efeito no volume de ar interno e na profundidade do meio de cultura nos frascos. Tais fatores também afetam a composição gasosa do frasco e, conseqüentemente, o crescimento e o desenvolvimento das culturas (Pereira et al., 2006).

Desta forma, alguns autores investigaram o volume do meio de cultura ideal para o cultivo de diferentes espécies (Carvalho et al., 1995; Reis et al., 2004; Pereira et al., 2006; Reis et al., 2007). Em outros trabalhos, foram testados diferentes volumes do recipiente em que as culturas foram cultivadas (Nicoloso & Erig, 2002; Camolesi et al., 2010).

Portanto diante dos resultados obtidos, em geral, o meio MS (50%) foi superior ao meio WPM. Nos volumes de 15 e 25 mL foram observadas as melhores respostas, dessa forma, sugere-se a utilização do volume de 15mL visando maior economia.

3.4 CONCLUSÕES

Os meios MS (50 e 25%) e WPM (100 e 50%) foram os mais eficientes na regeneração de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz.

Para a regeneração de plântulas foram observadas as melhores respostas em meio MS (50%) com volumes de 15 e 25 mL, dessa forma, sugere-se a utilização do volume de 15 mL visando maior economia.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTHAKRISHNAN, G.; RAVIKUMAR, R.; GIRIJA, S.; GANAPATHI, A. *In vitro* adventitious shoot formation from cotyledon explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 93, p. 343-355, 2002.

ALIYU, O. M.; AWOPETU, J. A. *In vitro* regeneration of hybrid plantlets of cashew (*Anacardium occidentale* L.) through embryo culture. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 548-553, 2005.

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

BOGGETTI, B.; JASIK, J.; MANTELL, S. *In vitro* multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glashouse-raised plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 456-461, 1999.

CAMOLSESI, M. R.; FARIA, R. T. de; NEVES, C. S. V. J.; MARTINS, A. N. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, Santa Maria, online, 2010.

CARVALHO, R.; FAVARETTO, N.; PINTO, J. E. B.; DESCHAMPS, C.; INNECCO, R. Influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Poir]. **Revista Ciência e Prática**, Lavras, v.19, n. 2, p. 158-164, 1995.

DAS, S.; JHA, T. B.; JHA, S. *In vitro* propagation of cashew nut. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, n. 8, p. 615-619, 1996.

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

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, 2007.

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

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. *In vitro* culture of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Research & Training Newsletter**, v. XVI, n. 1-4, 2001.

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

NICOLOSO, F. T. ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição Especial, p. 1499-1506, 2002.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, H. C. de A.; ROSADO, L.D.S.; BEIJO, L.A.; LAMEIRA, O.A. Proliferação *in vitro* de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.2, n.2, p.53-106, 2006.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; SOUZA, T. M.; FACHINELLO, J. C; OLIVEIRA, R. P. de. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GXN-9'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 95-101, 2009a.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P. de; FACHINELLO, J. C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 656-663, 2009b.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2009.

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

SHEIBANI, A.; VILLIERS, T. A.; Effect of explants type and culture medium on micropropagation of three Pistacia species. **Acta Horticulturae**, Hague, v. 419, p. 229-232, 1995.

SILVA, D. B. da; SILVA, J. A. da; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. de. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 2001.179p.

THIMMAPPAIAH; SHIRLY, R. A.; SADHANA, P. H. *In vitro* propagation of cashew from young trees. **In Vitro Cellular and Development Biology**, New York, v. 38, p. 152-156, 2002.

TORRES A. C.; BARBOZA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília-DF, 2001. 19 p. (**Circular Técnica**, n. 24).

CAPÍTULO 4 - CULTIVO *IN VITRO* DE *Anacardium othonianum* RIZZ.: II INFLUÊNCIA DO REGULADOR DE CRESCIMENTO, ORIENTAÇÃO DO EXPLANTE E LUMINOSIDADE

Kerley Cristina de Assis¹; Flávia Dionísio Pereira²; Paula Sperotto Alberto³; Fabiano Guimarães Silva⁴; José Waldemar Silva⁵; Carlos César Evangelista de Menezes⁶.
¹Mestranda, Produção Vegetal, UFG; ²Dr^a., Bolsista PNPd/FINEP; ³Bolsista de IC do PIBIC/CNPq-IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁴Dr. Professor IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁵Dr. Professor, UFU/Uberlândia-MG; ⁶Dr. CTC/COMIGO.

RESUMO - O *Anacardium othonianum* Rizz. é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro conhecida popularmente por caju de árvore do Cerrado. A reprodução usual dessa espécie ocorre sexuadamente ou assexuadamente, mas para a sua utilização em programas de reflorestamento ou implantação de pomares comerciais, existe uma demanda contínua de um grande número de mudas. Sob este aspecto, a micropropagação constitui uma alternativa eficaz para a preservação do material vegetativo assim como para a multiplicação destas espécies que têm interesse econômico. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de ANA e BAP, a orientação dos explantes e a influência da luminosidade na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz. No ensaio (I), foi utilizado o meio MS suplementado com nove combinações de ANA (0; 5,37; 10,74 μ M) e BAP (0; 4,44; 8,88 μ M). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC). Já o ensaio (II), foi conduzido em arranjo fatorial 2 x 2, testando a orientação do explante (vertical e horizontal) e a condição de incubação (ausência e presença de luz). Após 30 e 60 dias de cultivo foi avaliado número gemas, número e comprimento médio de folhas e plântulas. Concluiu-se que as concentrações de BAP e de ANA utilizadas não tiveram efeito na multiplicação de segmentos nodais de *Anacardium othonianum* Rizz. e, a melhor resposta morfofisiológica *in vitro* obteve-se quando os segmentos nodais foram inoculados na orientação horizontal na presença de luz.

Palavras-chave: espécie do Cerrado, meio de cultivo, micropropagação

CHAPTER 4 - *IN VITRO* CULTIVATION OF *Anacardium othonianum* RIZZ.: II EFFECT OF GROWTH REGULATOR, EXPLANT POSITION AND LIGHTING

Kerley Cristina de Assis¹; Flávia Dionísio Pereira²; Paula Sperotto Alberto³; Fabiano Guimarães Silva⁴; José Waldemar Silva⁵; Carlos César Evangelista de Menezes⁶.

¹Graduate Student, Plant Production, UFG; ²Dr., PNP/FINEP Fellow; ³Scholar student of IC do PIBIC/CNPq-IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁴Dr. Professor IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁵Dr. Professor, UFU/Uberlândia-MG; ⁶Dr. CTC/COMIGO.

ABSTRACT - *Anacardium othonianum* Rizz. is a native Brazilian savannah species commonly known as caju de árvore do Cerrado. The usual reproduction mode of this species is either sexually or asexually; however, for use in forestation programs or establishment of commercial orchards, there is a continuous demand for a large number of seedlings. In this aspect, micro propagation consists in an effective alternative for the preservation of the vegetative material as well as for the multiplication of economically important species. This study evaluated the effect of ANA and BAP, the position of the explants and the effect of lighting in the regeneration of nodal segments of *A. othonianum* Rizz. Trial (I), used the medium MS amended with nine combinations of ANA (0, 5.37, 10.74 μ M) and BAP (0, 4.44, 8.88 μ M). The experimental design was completely randomized (DIC). Trial (II), a 2 x 2 factorial, evaluated the position of the explant (vertical or horizontal) and incubation condition (absence or presence of light). After 30 and 60 days of growth, the number of buds, number and average length of leaves and plantlets were evaluated. It was concluded that the concentrations of BAP and ANA used had no effect on the multiplication of *Anacardium othonianum* Rizz. nodal segments, and that the best *in vitro* morpho-physiologic response was obtained when the nodal segments were inoculated horizontally, in the presence of light.

Keywords: savannah species, growth medium, micropropagation

4.1 INTRODUÇÃO

A vegetação do Cerrado possui características próprias que a individualiza dos demais tipos de vegetação e, por isso, vem ganhando importância os estudos básicos que buscam um melhor entendimento dos mecanismos de adaptações das espécies que habitam essa comunidade. Dentro da grande diversidade desse bioma, existem espécies frutíferas que possuem potencial de cultivo em sistemas tradicionais e, sob esse contexto, o *Anacardium othonianum* Rizz., conhecido popularmente como caju de árvore do cerrado, se destaca.

O *A. othonianum* Rizz. possui frutos oleaginosos, saborosos, comestíveis após torrado, com pericarpo idêntico ao do caju (*A. occidentale* L.) e do qual se extrai óleo-resina igualmente aplicado para combater as moléstias cutâneas; o pedúnculo carnosos é também saboroso, ácido e refrigerante, considerado anti-sifilítico. A casca do caule é empregada como antidiarréica, em forma de infuso e decocto. As flores são béquicas, sendo utilizadas em infusão (Silva et al., 2001).

As espécies de *Anacardium* são perenes e predominantemente alógamas, com alto grau de heterozigose das populações naturais, já que o processo natural de propagação é por sementes (Araújo & Silva, 1995). Em geral é possível que as plantas do gênero *Anacardium* se propagem sexualmente e assexualmente (garfos, gemas e estacas), mas para a sua utilização em programas de reflorestamento ou implantação de pomares comerciais, requer a produção contínua de um grande número de mudas. Em condições naturais ou de viveiros, a germinação é irregular e lenta e estas limitações inviabilizam tanto a produção racional de mudas como a utilização na fruticultura e na silvicultura (Valle Filho, 1991; Oliveira, 2008). Assim sendo, a micropropagação utilizando técnicas de cultura de tecidos tem sido um valioso instrumento na propagação de algumas espécies de Anacardiaceae (Boggetti et al., 1999; Das et al., 1999; Mneney & Mantell, 2002; Sansberro et al., 2003; Prakash & Staden, 2008), contudo, a multiplicação em escala comercial necessita de um melhor conhecimento dos fatores que controlam a morfogênese *in vitro* e que limitam a taxa de multiplicação e o enraizamento.

Sistemas convencionais de indução de respostas morfogênicas podem ser melhorados manipulando *in vitro* os fatores que as determinam. Vários fatores podem influenciar no potencial regenerativo de uma espécie e a necessidade de selecionar o tipo de meio e, a adição ou não de regulador de crescimento, o tipo de explante e o ambiente que o envolve é completamente dependente do objetivo a ser alcançado, pois os seus efeitos se diferem. Ensaio específicos são imprescindíveis para estabelecer um protocolo ideal com suas combinações e concentrações eficazes para induzir a resposta esperada (Silva et al., 2005; Fogaça et al., 2007).

Apesar da importância econômica de *A. othonianum* Rizz. para região, não há relatos sobre o cultivo *in vitro* desta espécie, por isso, objetivou-se neste trabalho avaliar procedimentos básicos tais como a relação auxina/citocinina, orientação dos explantes e a influência da luminosidade na regeneração de segmentos nodais da espécie.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Cerrados, do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, GO.

Material vegetal, assepsia

Os frutos maduros de caju de árvore do cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) foram coletados em outubro de 2008, na fazenda Gameleira, município de Montes Claros, GO, com as coordenadas geográficas 16° 06' 20" S – 51° 17' 11" W a 592 m de altitude. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás - Campus de Jataí, sob o número de coleta 3793.

Realizou-se a despolpa dos frutos manualmente, seguido de lavagem do material em água corrente para a eliminação dos resíduos. Após a despolpa, as sementes foram postas sobre folhas de papel toalha em temperatura ambiente para se retirar o excesso de umidade superficial. Em seguida, foi realizado a seleção manual e o descarte das sementes malformadas. As sementes utilizadas foram tratadas com fungicida Vitavax-

Thiram[®] [Ingrediente Ativo (carboxina + tiram): 200 + 200 g/L] na dosagem de 300 mL para 100 kg de sementes. Após o tratamento, foram desidratadas em contato direto com sílica gel em bandejas plásticas (35x30x8 cm) até atingir o teor de água de 13%. Posteriormente, foram embaladas em saco plástico e armazenadas em BOD sob temperatura de 18°C.

Retirou-se das sementes armazenadas porções de 100 que foram germinadas em bandejas plásticas (50x35x8 cm) contendo areia lavada como substrato. As bandejas foram mantidas em ambiente controlado com temperatura média de 25,61°C e umidade relativa de 58,18%. O controle fitossanitário foi feito por meio de pulverizações com solução fungicida sistêmica de Derosal[®] a 0,2% do produto comercial, com 24 horas antes da coleta dos explantes. Quinzenalmente, foram feitas regas com solução nutritiva composta pelos sais nutritivos do meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Após 30 dias da semeadura, quando as plantas estavam com aproximadamente 4 cm de comprimento, segmentos nodais foram retirados e utilizados como fonte de explante.

Estabelecimento *in vitro*

Os segmentos nodais retirados das plantas matrizes permaneceram em recipientes com água corrente e três gotas de detergente neutro por 20 minutos. Posteriormente, os segmentos nodais foram imersos em álcool 70% (v/v) por 30 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (20%) durante 15 minutos. Finalmente, os explantes foram lavados em câmara de fluxo laminar por três vezes, em água destilada e autoclavada.

Os segmentos foram excisados com aproximadamente 2 cm e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. O meio utilizado foi MS (50%) suplementado com 3% de sacarose, 2 g.L⁻¹ de carvão ativo e 30 µM de BAP (6-Benzilaminopurina). Em experimentos preliminares (dados não mostrados), observou-se que utilizando o BAP nesta concentração havia um melhor crescimento dos explantes. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,3 antes da autoclavagem. Os tubos

inoculados foram mantidos no escuro, em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 30 dias.

Após este período de escuro, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico ao que lhes deram origem, e foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por mais 30 dias. Decorridos 60 dias de cultivo *in vitro*, foram feitas as avaliações de crescimento descritas nos Ensaio I e II.

ENSAIO (I) Avaliação da relação auxina/citocinina na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz

Segmentos nodais, com aproximadamente 2 cm de comprimento, contendo duas gemas foram utilizados como fonte de explantes. Estes segmentos foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo meio MS sólido suplementado com 2 g.L^{-1} de carvão ativo e diferentes concentrações de auxina e citocinina.

Nove combinações de ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-Benzilaminopurina) foram averiguadas (μM): **(T1)** 0 ANA + 0 BAP; **(T2)** 0 ANA + 4,44 BAP; **(T3)** 0 ANA + 8,88 BAP; **(T4)** 5,37 ANA + 0 BAP; **(T5)** 5,37 ANA + 4,44 BAP; **(T6)** 5,37 ANA + 8,88 BAP; **(T7)** 10,74 ANA + 0 BAP; **(T8)** 10,74 ANA + 4,44 BAP; **(T9)** 10,74 ANA + 8,88 BAP. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Aos 30 dias, avaliou-se o número gemas e o número e comprimento médio de folhas por explante. As plântulas obtidas durante este período foram avaliadas, excisadas e inoculadas para o mesmo meio que lhes deram origem. Depois de decorridos mais 30 dias de subcultivo (60 dias de cultivo), novas avaliações foram realizadas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e cada tratamento continha 25 repetições, cada qual constituída por um tubo, totalizando 225 unidades experimentais em cada subcultivo (30 e 60 dias).

Os dados numéricos de gemas e de folhas foram submetidos à análise de variância utilizando o software R (Development Core Team, 2009), sendo as médias comparadas através de contrastes por modelos lineares não generalizados. Já o comprimento médio de plântulas e de folhas foram avaliados estatisticamente, por meio de análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2003). Foi utilizado também estatística descritiva com médias e erro padrão (n=25).

ENSAIO (II) Avaliação da orientação do explante e condições de luminosidade na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.

Utilizou-se como fonte de explante segmentos nodais, com aproximadamente 2 cm de comprimento, contendo duas gemas. Estes segmentos foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo meio MS (50%) sólido suplementado com 2 g.L⁻¹ de carvão ativo, 30 µM de BAP e pH ajustado para 5,7 ± 0,3 antes da autoclavagem.

Os segmentos nodais foram inoculados no meio de cultura em duas orientações: 1) horizontalmente sobre a superfície do meio de cultura; 2) verticalmente na posição normal, com a extremidade basal do segmento inserido no meio de cultura a uma profundidade de 2-3 mm.

Após inoculação, os tubos contendo os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz e sob fotoperíodo de 16 horas, com temperatura de 25 ± 3°C e radiação fotossintética ativa de 45-55 µmol m⁻² s⁻¹.

Aos 30 dias, avaliou-se o número gemas e número e comprimento médio de folhas por explante. As plântulas obtidas durante este período foram avaliadas, excisadas e inoculadas para o mesmo meio que lhes deram origem e, após decorridos mais 30 dias de subcultivo (60 dias de cultivo), novas avaliações foram realizadas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 2 x 2 (orientação do explante x luminosidade) e cada tratamento continha 25

repetições, cada qual constituída por um tubo, totalizando 100 unidades experimentais em cada subcultivo.

Os dados numéricos de gemas e de folhas foram submetidos à análise de variância utilizando o software R (Development Core Team, 2009), sendo as médias comparadas através de contrastes por modelos lineares não generalizados. Já o comprimento médio de plântulas e de folhas foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2003).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO (I) Avaliação da relação auxina/citocinina na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz

Pode-se constatar que em todos os tratamentos utilizados houve a regeneração das gemas axilares dos segmentos nodais em plântulas. Todos os segmentos nodais utilizados regeneram-se em plântulas bem formadas, vigorosas e com a coloração verde escura, característica da planta matriz. Por meio de observações visuais constatou-se a ausência de plântulas com alterações morfológicas ou oxidadas e a inexistência de raízes. Também não foi observado o crescimento em forma de massagema (clusters) e nem a presença de calos (Figura 4.1).

Aos 30 e 60 dias de cultivo, observou-se que não houve efeito significativo dos reguladores de crescimento para as características avaliadas (Figura 4.2 e Tabela 4.1).

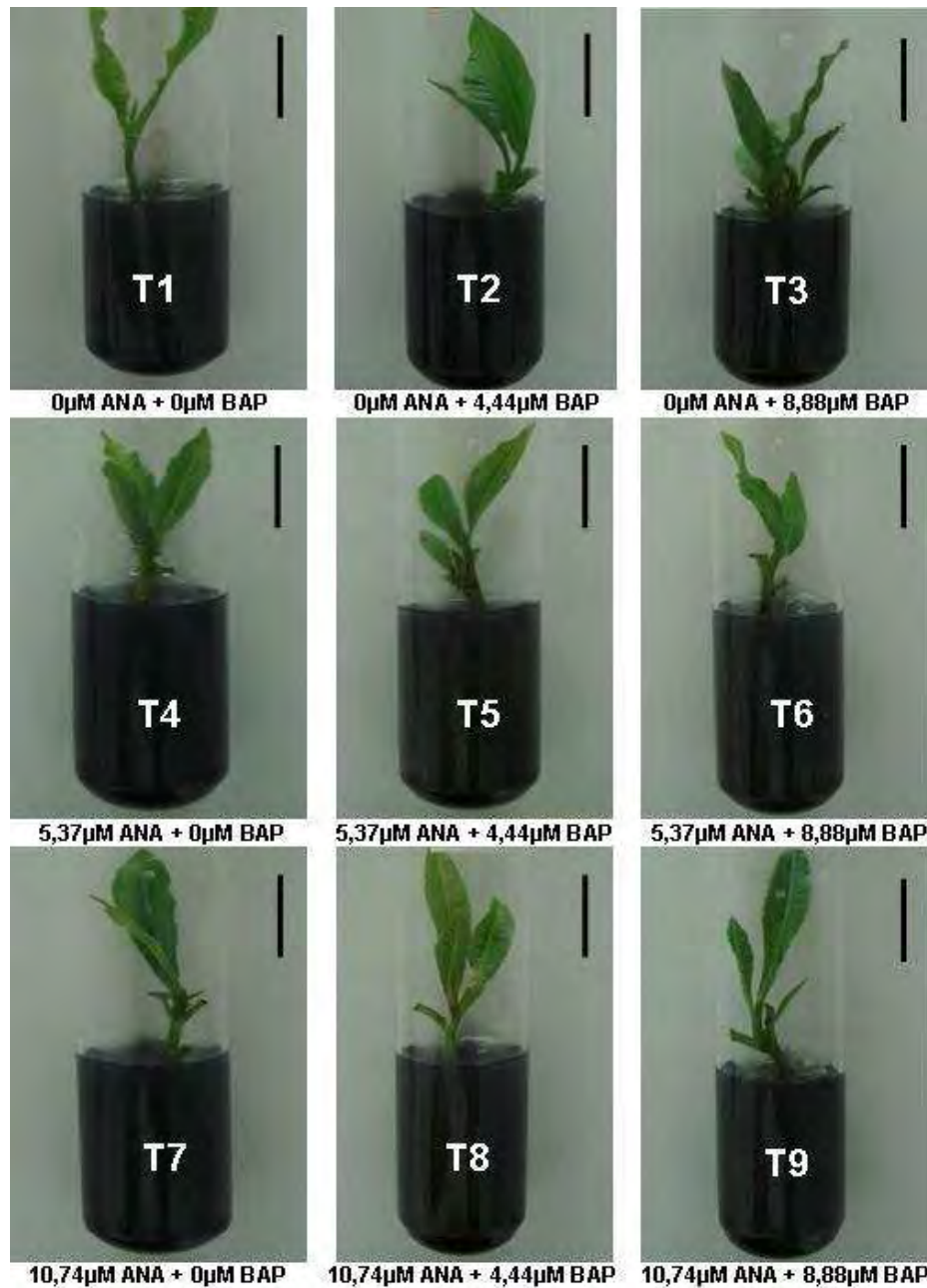
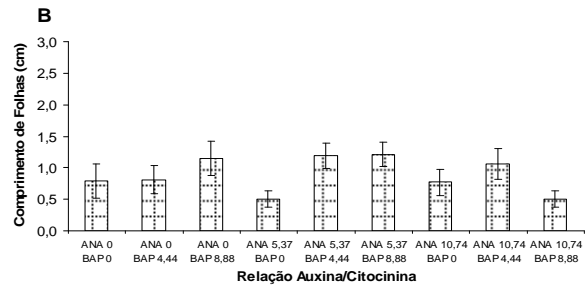
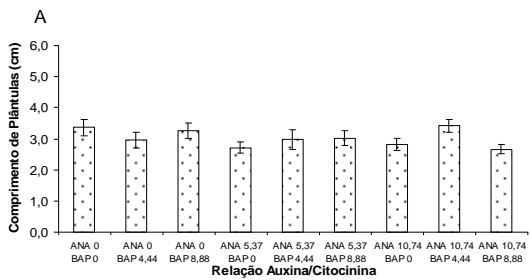


Figura 4.1. Plântulas de *A. othonianum* Rizz. aos 60 dias de cultivo. Tratamentos (μM): **(T1)** 0 ANA + 0 BAP; **(T2)** 0 ANA + 4,44 BAP; **(T3)** 0 ANA + 8,88 BAP; **(T4)** 5,37 ANA + 0 BAP; **(T5)** 5,37 ANA + 4,44 BAP; **(T6)** 5,37 ANA + 8,88 BAP; **(T7)** 10,74 ANA + 0 BAP; **(T8)** 10,74 ANA + 4,44 BAP; **(T9)** 10,74 ANA + 8,88 BAP. Barra= 10 mm. Rio Verde, GO, 2009.

30 Dias



60 Dias

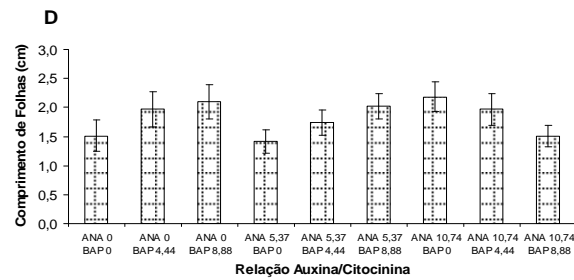
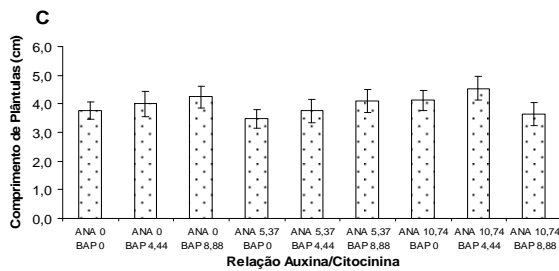


Figura 4.2. Comprimento médio de plântulas (A e C), Comprimento médio de folhas (B e D) de *A. othonianum* Rizz., respectivamente, aos 30 e 60 dias de cultivo, em função da relação auxina/citocinina (μM). Médias e erro padrão ($n=25$). Rio Verde, GO, 2009.

Tabela 4.1. Análise de contrastes entre os tratamentos para número de folhas e gemas de *A. othonianum* Rizz., aos 30 e 60 dias, em função da relação auxina/citocinina. Tratamentos (μM): (T1) 0 ANA + 0 BAP; (T2) 0 ANA + 4,44 BAP; (T3) 0 ANA + 8,88 BAP; (T4) 5,37 ANA + 0 BAP; (T5) 5,37 ANA + 4,44 BAP; (T6) 5,37 ANA + 8,88 BAP; (T7) 10,74 ANA + 0 BAP; (T8) 10,74 ANA + 4,44 BAP; (T9) 10,74 ANA + 8,88 BAP. Rio Verde, GO, 2009.

Contraste	Dias	Variável	Estimativa	Erro Padrão	Pr(> z)
T1 vs T2, T3, T4, T7, T5, T6, T8, T9	30	Nº Folhas	0,13	0,15	0,36 ^{n.s}
		Nº Gemas	0,36	0,18	0,45 ^{n.s}
	60	Nº Folhas	0,19	0,10	0,44 ^{n.s}
		Nº Gemas	0,14	0,17	0,40 ^{n.s}

^{NS} não significativo.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que o tratamento sem regulador de crescimento permitiu o mesmo crescimento dos explantes cultivados com regulador. A resposta não significativa das características analisadas ao uso de ANA e BAP nas condições testadas, permite inferir que as concentrações utilizadas não foram satisfatórias para suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de fitormônio nos explantes, não estimulando a resposta desejável na taxa de multiplicação, pois permitiram apenas o crescimento em comprimento sem brotações múltiplas. Desta forma, decidiu-se por verificar a necessidade dos outros componentes inertes ao cultivo *in vitro*.

ENSAIO (II) Avaliação da orientação do explante e condições de incubação na regeneração de segmentos nodais de *A. othonianum* Rizz.

Nas avaliações realizadas, verificou-se que a interação orientação dos explantes x luminosidade foi significativa apenas para o comprimento de folhas ($P \leq 0,05$) quando os explantes foram cultivados até 30 dias; Observou-se, ainda, que o maior comprimento de folhas na presença de luz se deu quando os explantes estavam inoculados horizontalmente, média de 0,99 folhas por explante (Tabela 4.2).

Quanto ao efeito isolado da orientação dos explantes, esse foi significativo para o comprimento de plântulas e folhas aos 30 dias ($P \leq 0,05$). Os segmentos nodais inoculados horizontalmente tiveram maior comprimento de folhas (0,49 cm) e de plântulas (2,39 cm), diferindo dos segmentos inoculados na orientação vertical, médias (0,08 cm e 2,02 cm respectivamente). Nas avaliações feitas aos 60 dias, os explantes não diferiram. No comprimento médio de folhas obteve-se média de 0,93 cm para a orientação vertical e 0,99 cm para horizontal. Quanto ao comprimento de plântulas, as médias foram de 2,58 cm para a orientação vertical e 2,77 cm para horizontal (Tabela 4.2).

Com relação à luminosidade, aos 30 dias houve diferença tanto para variável comprimento de folhas quanto de plântulas. As folhas e as plântulas cresceram mais quando estavam iluminadas, média de 0,58 cm e 2,39 cm respectivamente. Aos 60

dias, observou-se o mesmo comportamento, tanto folhas quanto as plântulas cresceram mais quando iluminadas, médias de 1,87 cm e 3,30 cm respectivamente (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Comprimento médio de plântulas e de folhas de *A. othonianum* Rizz. aos 30 e 60 dias de cultivo, em função da orientação do explante e luminosidade. Rio Verde-GO, 2009.

30 dias de cultivo				
Variável (cm)	Orientação	Luminosidade		Médias
		Presença	Ausência	
Comprimento de folhas	Vertical	0,17 b A	0,00 a A	0,08 b
	Horizontal	0,99 a A	0,00 a B	0,49 a
Médias		0,58 A	0,00 B	
Comprimento de plântulas	Vertical	2,10	1,94	2,02 b
	Horizontal	2,68	2,10	2,39 a
Médias		2,39 A	2,02 B	
60 dias de cultivo				
Variável (cm)	Orientação	Luminosidade		Médias
		Presença	Ausência	
Comprimento de folhas	Vertical	1,77	0,10	0,93 a
	Horizontal	1,98	0,00	0,99 a
Médias		1,87 A	0,05 B	
Comprimento de plântulas	Vertical	3,24	1,92	2,58 a
	Horizontal	3,36	2,18	2,77 a
Médias		3,30 A	2,05 B	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, e pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Pela análise de contraste entre os tratamentos (Tabela 4.3), verificou-se efeito significativo na avaliação feita aos 30 dias quando contrastado à orientação do explante com a luminosidade. O efeito da orientação horizontal na presença de luz foi superior para a variável número de folhas. Nos demais contrastes não houve efeito significativo. Nas avaliações feitas aos 60 dias de cultivo, verifica-se que houve efeito significativo quando contrastado a luminosidade com a orientação do explante na variável número de folhas. A presença de luz foi superior ao efeito da ausência de luz nos explantes

cultivados verticalmente. Não houve efeito significativo nos demais contrastes (Tabela 4.3).

Por meio de observações visuais, verificou-se que, em ambas as orientações em que se cultivaram os explantes, houve a regeneração de plântulas, embora, não se notasse a formação foliar naqueles mantidos no escuro. Além disso, eles tinham a coloração branca decorrente do estiolamento. As plântulas regeneradas sob a luz eram bem formadas e vigorosas e, não houve nenhuma alteração morfológica e nem formação de calos (Figura 4.3).

No geral, verificou-se que os resultados mais eficientes foram obtidos quando os explantes estavam iluminados e inoculados horizontalmente, tanto para os explantes cultivados aos 30 como aos 60 dias (Tabela 4.2 e 4.3). A orientação não sortiu efeito no crescimento dos explantes aos 60 dias de cultivo. No entanto, cultivar os explantes na orientação vertical nesta fase é mais interessante por ser mais ágil a inoculação, pois os explantes estão maiores e mais vigorosos; mantê-los na posição horizontal é difícil para ajustá-los ao tubo de ensaio e, à medida em que os explantes vão crescendo, o espaço do tubo fica restrito, prejudicando tanto o crescimento foliar quanto a variável número de folhas.

Vários autores ressaltam que os explantes quando cultivados horizontalmente são mais eficientes por promover maior contato do explante com o meio de cultura, o que favorece a absorção dos componentes disponíveis (Erig & Schuch, 2002; Silva et al., 2005; Pereira et al., 2006; Erig & Schuch, 2006; Santos et al., 2009). Esta superioridade também está relacionada à quebra da dominância apical induzida pelo ápice vegetativo porque inibe a translocação das auxinas, cujo transporte é polar na planta e, dessa forma, estimula o crescimento das gemas laterais (Erig & Schuch, 2006; Santana et al., 2009).

Tabela 4.3. Análise de contrastes entre os tratamentos para número de folhas e gemas de *A. othonianum* Rizz. aos 30 e 60 dias de cultivo, em função da orientação do explante e condições de incubação. **OV**= orientação vertical; **OH**= orientação horizontal; **P**= presença de luz; **A**= ausência de luz. Rio Verde-GO, 2009.

30 dias de cultivo				
Contraste Fixado	Contrastes	Estimativa	Erro Padrão	Pr(> z)
Número de folhas				
Luminosidade (P/A)	OV+P vs OV+A	18,87	0,37	0,99 ^{n.s}
	OH+P vs OH+A	20,28	0,37	0,99 ^{n.s}
Orientação (OV/OH)	P+OV vs P+OH	-1,15	0,46	0,01*
	A+OV vs A+OH	-5,35	0,43	1,00 ^{n.s}
Número de gemas				
Luminosidade (P/A)	OV+P vs OV+A	18,16	0,32	0,99 ^{n.s}
	OH+P vs OH+A	-0,13	0,51	0,79 ^{n.s}
Orientação (OV/OH)	P+OV vs P+OH	0,13	0,51	0,79 ^{n.s}
	A+OV vs A+OH	-18,16	0,32	0,99 ^{n.s}
60 dias de cultivo				
Contraste Fixado	Contrastes	Estimativa	Erro Padrão	Pr(> z)
Número de folhas				
Luminosidade (P/A)	OV+P vs OV+A	2,39	0,60	0,00 *
	OH+P vs OH+A	19,77	0,32	0,99 ^{n.s}
Orientação (OV/OH)	P+OV vs P+OH	-0,19	0,23	0,41 ^{n.s}
	A+OV vs A+OH	17,18	0,32	0,99 ^{n.s}
Número de gemas				
Luminosidade (P/A)	OV+P vs OV+A	0,06	0,34	0,86 ^{n.s}
	OH+P vs OH+A	-0,64	0,37	0,08 ^{n.s}
Orientação (OV/OH)	P+OV vs P+OH	0,43	0,38	0,26 ^{n.s}
	A+OV vs A+OH	-0,27	0,33	0,41 ^{n.s}

*significativo a 5% de probabilidade; ^{NS} não significativo.

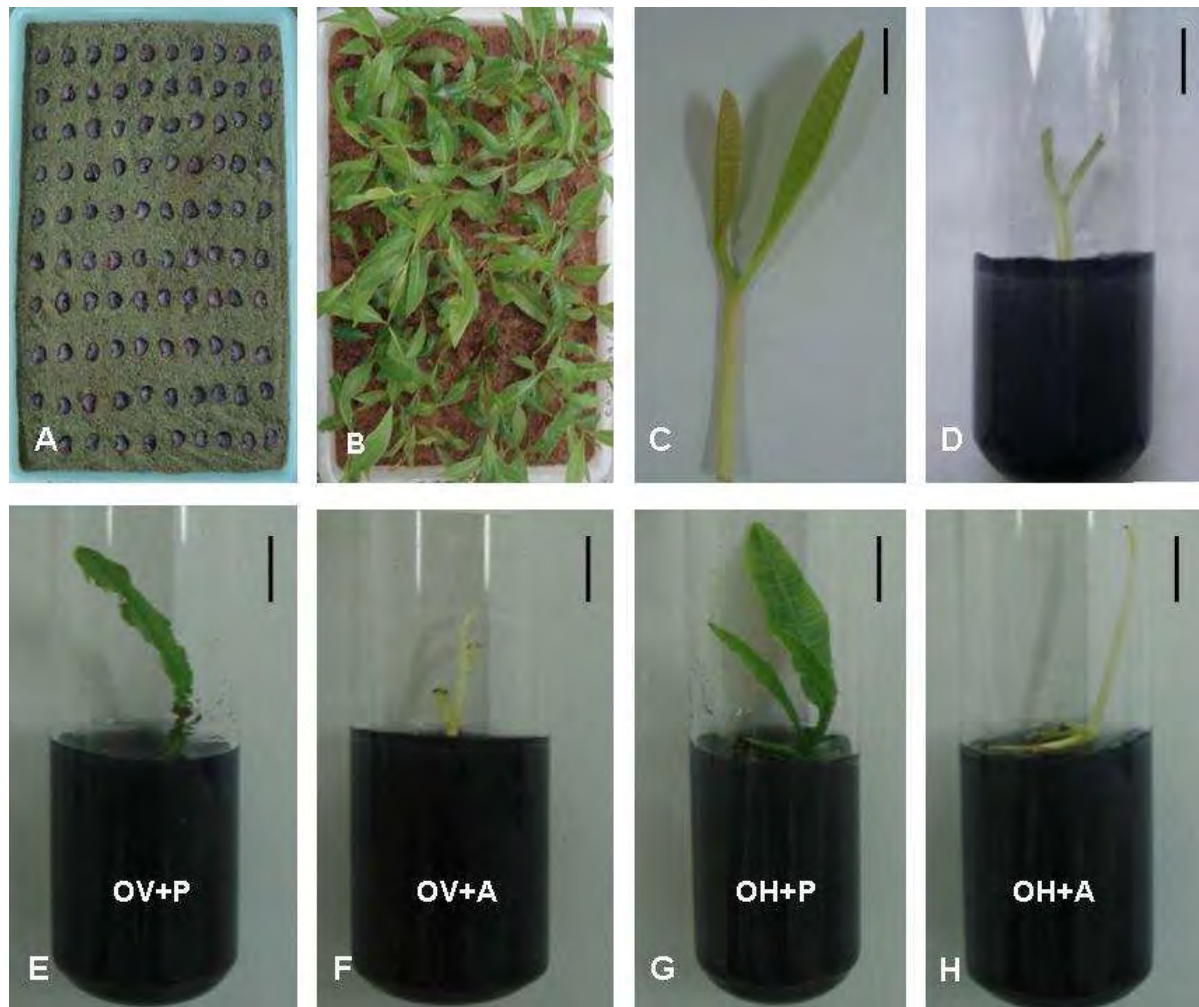


Figura 4.3. Sementes cultivadas em bandejas (A); plantas germinadas em bandejas (B); ápice retirado de plantas germinadas em bandejas (C); segmento nodal estabelecido *in vitro* (D); plântulas de *A. othonianum* Rizz., aos 60 dias de cultivo (E, F, G, H). Orientação vertical (OV); orientação horizontal (OH); presença de luz (P); ausência de luz (A). Rio Verde-GO, 2009. Barra= 10mm

A luminosidade tem efeito pronunciado no crescimento e desenvolvimento de um vegetal e pode modificar certas características morfológicas. O cultivo de plantas no escuro é sugerido para que os internódios da planta se alonguem, separando os nós que, normalmente, em presença de luz, permanecem próximos uns aos outros. Para fins de propagação, a separação dos nós facilita o desenvolvimento de gemas axilares e a manipulação de plântulas regeneradas (Pereira et al., 2008). Outra contribuição importante no cultivo de plantas no escuro diz respeito à remoção de substâncias fenólicas muito comuns em espécies lenhosas. Apesar disso, o cultivo de plantas no

escuro necessita ser adaptado as necessidades das espécies, pois estas diferem geneticamente entre si podendo ocorrer resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo.

O estudo da luminosidade *in vitro* é um assunto bastante questionado por vários autores. Santos et al. (2009), relata que em seus estudos realizados com pequizeiro (*Caryocar brasiliense* A. St.-Hil.) as brotações se desenvolveram melhor na presença de luz e tiveram maior comprimento ao serem cultivadas na ausência de luminosidade. Resultados similares, que comprovam o benefício da luz na micropropagação de laranja azeda a partir de segmentos de epicótilo, foram reportados por Silva et al. (2008). Resultados contrários foram constatados por Silva et al. (2005) onde o cultivo de Tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan) induziu máxima proliferação de gemas adventícias *in vitro* em condições de escuro. Da mesma forma, Duran-Vila et al. (1992) também observaram que a inoculação de explantes de laranja Pineapple (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) no escuro aumentou a regeneração de gemas e brotações.

4.4 CONCLUSÕES

As concentrações de ANA e BAP utilizadas não tiveram efeito na multiplicação de segmentos nodais de *Anacardium othonianum* Rizz.;

A melhor resposta morfofisiológica *in vitro* foi obtida quando os segmentos nodais foram inoculados na orientação horizontal na presença de luz.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.P.P. e SILVA, V.V. **Cajucultura:** Modernas Técnicas de Produção. EMBRAPA/CNPAT, Fortaleza, 1995. p.73-96.

BOGGETTI, B.; JASIK, J.; MANTELL, S. *In vitro* multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glashouse-raised plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 456-461, 1999.

DAS, S.; JHA, T. B.; JHA, S. Factors affecting in vitro development of embryonic axes of cashewnut. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, p.135-144, 1999.

DURAN-VILA, N.GORGOCENA, Y; ORTEGA, V.; ORTIZ, J. NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of swett orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]: effect of temperature and photosynthetic radiation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 29, p. 11-18, 1992.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de Mirtilo. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 83-88, 2006.

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.

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

FOGAÇA, L. A.; DORTZBACH, D.; ALVES, A. C.; PEDROTTI, E. L. Características morfofisiológicas de brotos micropropagados de Agapantho sob diferentes intensidades luminosas e concentrações de sacarose. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 371-378, 2007.

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. Clonal propagation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford Kent, v. 6, n. 7, p. 649-657, 2002.

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

OLIVEIRA, V. H. de. Cajucultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 0-0, 2008.

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; RODRIGUES, H. C. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, O. A. Micropropagation of the fiber-rich Amazonian species *Ananas ertifolius* (Bromeliaceae). **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 2134-2137, 2008.

PRAKASH, S.; STANDEN, J. V. Micropropagation of *Searsia dentata*. **In vitro Cellular and Development Biology**, New York, v. 44, p. 338-341, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2009.

SANSBERRO, P.; REY, H.; MROGINSKI, L.; LUNA, C. *In vitro* planted regeneration of *Schinopsis balansae* (Anacardiaceae). **Trees**, Corrientes, v. 17, p. 542-546, 2003.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; LIMA-BRITO, A.; PEREIRA, F. D.; NEPOMUCENO, C. F. Influence of explant polarity on morphogenesis responses of *Annona squamosa* L. cultivated *in vitro*. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 9, n. 4, p. 263-268, 2009.

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

SILVA, D.B. da; SILVA, J.A.da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.de. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 2001.179p.

SILVA, R. P. da; COSTA, M. A. P. de C.; SOUZA, A. da S.; ALMEIDA, W. A. B. de. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 12, p. 1153-1159, 2005.

SILVA, R. P.; MENDES, B. M. J.; MAGALHÃES FILHO, F. A. A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n.10, p. 1331-1337, 2008.

SILVA, R. P.S.; SOUZA, E.S.; REBOUÇAS, F.S.; ALMEIDA, W.A.B. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de Tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.484-487, 2005.

VALLE FIHO, G.M. Cerrado: Desenvolvimento auto-sustentável. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.15, n.168, p.3, 1991.

CAPÍTULO 5 – EFEITO DA SACAROSE E DA VEDAÇÃO NA ANATOMIA FOLIAR DE BROTAÇÕES DE *Anacardium othonianum* RIZZ. CULTIVADO *IN VITRO*

Kerlley Cristina de Assis¹; Flávia Dionísio Pereira²; Jaqueline Martins Vasconcelos³; Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho⁴; Fabiano Guimarães Silva⁵; José Waldemar Silva⁶; Carlos César Evangelista de Menezes⁷. ¹Mestranda, Produção Vegetal, UFG; ²Dr^a., Bolsista PNP/ FINEP; ³Bolsista de IC do PIBIC/CNPq-IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁴Professor IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁶Dr. Professor UFU/Uberlândia-MG; ⁷Dr. CTC/COMIGO.

RESUMO - O sucesso no estabelecimento e multiplicação de uma determinada espécie vegetal *in vitro* está sujeita à influência de diversos fatores que atuam em cada fase deste processo. Na busca de soluções para aproximar o ambiente *in vitro* das condições em que as culturas crescem *in vivo*, este trabalho propôs avaliar a influência da sacarose e da vedação na anatomia foliar de brotações de *Anacardium othonianum* Rizz. cultivados *in vitro*. No cultivo *in vitro* utilizou-se dois tipos de meios: 1) meio WPM, suplementado com 4 g.L⁻¹ de ágar, 2 g.L⁻¹ de carvão ativo, 87,34 µM de sacarose e 5,9 µM de AIB (ácido-indolbutírico); 2) meio igual ao anterior ausente de sacarose. Após 30 e 60 dias de cultivo foram avaliados o comprimento das plântulas (cm), o número e o comprimento médio de folhas (cm) por explante. Após as avaliações realizadas aos 60 dias de cultivo *in vitro*, foram selecionadas 10 plantas de cada tratamento, das quais se retiraram a segunda folha expandida, nessas folhas foram realizadas a caracterização anatômica e medições da espessura foliar. Ainda quantificou-se o número de células epidérmicas, o número de estômatos, a densidade estomática (número de estômatos/mm²) e o índice estomático (%). Com os resultados deste trabalho, concluiu-se que a sacarose e o tampão de algodão influenciam na plasticidade adaptativa das plântulas de *A. othonianum* Rizz. produzidas *in vitro*. A sua utilização são condições satisfatórias para a fase anterior à aclimatização.

Palavras-chave: fotoautotrófico, micropropagação, ventilação

CHAPTER 5 – EFFECT OF SUCROSE AND CAPPING ON LEAF ANATOMY OF *Anacardium othonianum* RIZZ SPROUTS GROWN *IN VITRO*

Kerlley Cristina de Assis¹; Flávia Dionísio Pereira²; Jaqueline Martins Vasconcelos³; Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho⁴; Fabiano Guimarães Silva⁵; José Waldemar Silva⁶; Carlos César Evangelista de Menezes⁷. ¹Graduate Student, Plant Production, UFG; ²Dr., PNPd/ FINEP Fellow; ³Scholar student of IC - PIBIC/CNPq-IFGoiano/Rio Verde-GO; ⁴Professor IFGoiano/ Rio Verde-GO; ⁶Dr. Professor UFU/Uberlândia-MG; ⁷Dr. CTC/COMIGO.

ABSTRACT – Success of *in vitro* establishment and multiplication of a given plant species is subject to the effect of several factors that act in each phase of this process. The search for solutions to close the gap between the *in vitro* conditions and the *in vivo* environment where plants grow guided this study, in which the effect of sucrose and capping on leaf anatomy of sprouts of *in vitro* grown *Anacardium othonianum* Rizz. were evaluated. Two media were used for *in vitro* cultivation: 1) WPM medium, amended with 4 g.L⁻¹ agar, 2 g.L⁻¹ active charcoal, 87.34 µM sucrose and 5.9 µM AIB (indol butyric acid); 2) a medium similar to the previous one, except for the sucrose, which was missing. After 30 and 60 days of growth, plantlet length (cm), and number and average length of leaves (cm) per explant were evaluated. Ten plantlets in each treatment were selected after the second evaluation, and the second expanded leaf was removed for the anatomical characterization and measurement of leaf thickness. Also, the number of epidermal cells, stoma, stomata density (number of stoma/mm²) and the stoma index (%) were determined. The results of this study indicate that sucrose and cotton capping affected the adaptative plasticity of *A. othonianum* Rizz. plantlets produced *in vitro*, and their use provided adequate conditions for the step previous to climatization.

Keywords: photoautotrophic, micropropagation, airing

5.1 INTRODUÇÃO

O *Anacardium othonianum* Rizz. é uma espécie frutífera nativa do Cerrado brasileiro conhecida popularmente como caju de árvore do cerrado. A espécie oferece grande potencial para exploração econômica, constituindo-se em uma nova alternativa principalmente para as populações que habitam este bioma.

As espécies de *Anacardium* são perenes e possuem alto grau de heterozigose. Sua propagação se dá via sementes e em condições naturais ou de viveiros, a germinação é irregular e lenta limitando a produção racional de mudas como a utilização em programas de reflorestamento (Valle Filho, 1991). Por tal motivo, justificase a elaboração de cultivos alternativos e, neste sentido, o cultivo *in vitro* surge como uma escolha promissora.

O sucesso no estabelecimento e na multiplicação de uma determinada espécie vegetal *in vitro* está sujeita à influência de diversos fatores que atuam em cada fase desse processo. A concentração dos sais e dos reguladores de crescimento nos meios de cultura, bem como a temperatura e fotoperíodo são os fatores que mais diferem entre as espécies micropropagadas, porém de igual importância destaca-se a utilização ou não de fonte de carbono e o uso de tampas empregadas no processo de fechamento dos frascos, pois esses fatores também podem influenciar no desenvolvimento *in vitro* significativamente (Souza et al., 1999).

Habitualmente as culturas mantidas *in vitro* são heterotróficas e a sacarose é a principal fonte de carbono utilizada para facilitar o crescimento dos explantes. Dessa forma, as mudas produzidas heterotroficamente não operam eficientemente na absorção de luz, de água e de nutrientes, o que pode induzir alterações na funcionalidade de órgãos e tecidos, determinando a formação de plantas com morfologia, anatomia e fisiologia anormais, tornando a aclimatização crítica e limitante ao processo de micropropagação (Pospíšilová, 1999; Dosseau et al, 2008; Scaranari, Leal, Pellegrino, 2008).

Na busca de soluções para aproximar o ambiente *in vitro* das condições em que as culturas crescem *in vivo*, alguns autores sugerem o estímulo a fotoautotrofia com a

redução ou a eliminação de carboidratos do meio e o aumento da aeração das culturas (Fluentes et al., 2005; Skrebsky et al., 2006; Santana et al., 2008; Rodrigues, Melo, Aloufa, 2008). Tais procedimentos têm melhorado o desempenho das plantas cultivadas *in vitro*, aumentando a taxa de sobrevivência das mesmas e originando plantas anátomo-fisiológicas mais adaptadas ao processo de aclimatização (Santana et al., 2008).

Sob esse contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da sacarose e da vedação na anatomia foliar de brotações de *Anacardium othonianum* Rizz. cultivados *in vitro*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Cerrado, do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, GO. A exsicata da espécie está depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí, sob o registro nº. 3793.

Cultivo *in vitro*: Influência da sacarose e do tipo de vedação

O experimento foi conduzido sob condição de crescimento de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas sob radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecidos por lâmpadas fluorescentes.

Obteve-se os explantes a partir de brotações provenientes da multiplicação *in vitro* conduzidos em meio MS (50%), metade da concentração original dos sais Murashige & Skoog (1962), sem regulador de crescimento. Os brotos produzidos, com aproximadamente 4 cm e com 2 a 3 folhas expandidas foram transferidos para dois meios de cultura: 1) Meio WPM (Lloyd e Mccown, 1980) suplementado com 4 g.L^{-1} de ágar, 2 g.L^{-1} de carvão ativo, $87,34 \mu\text{M}$ de sacarose e $5,9 \mu\text{M}$ de AIB (ácido-indolbutírico); 2) meio igual ao anterior ausente de sacarose. O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,3$ antes da autoclavagem e utilizou-se 20 mL de meio de cultura em tubos de ensaio (25 x 150 mm).

Os tubos foram vedados de três maneiras: tampa plástica sem película de PVC, tampa plástica envolvida com película de PVC e tampão de algodão.

As avaliações foram realizadas aos 30 e 60 dias após a instalação do experimento. As variáveis analisadas foram: comprimento de plântulas (cm), número e comprimento médio de folhas (cm) por explante. Após a primeira avaliação (aos 30 dias), as plântulas obtidas durante esse período foram analisadas e transferidas para o mesmo meio que lhes deram origem. Decorridos mais 30 dias de subcultivo, novas avaliações foram efetuadas (aos 60 dias).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 2 x 3 (concentrações de sacarose x tipos de vedação), com 25 repetições cada qual constituída por um tubo, totalizando 150 unidades experimentais. Os dados numéricos de folhas foram submetidos à análise de variância utilizando o software R (R-Development Core Team, 2009), sendo as médias comparadas através de contrastes por modelos lineares não generalizados. Já o comprimento médio de plântulas e de folhas foi avaliado estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2003).

Estudos Anatômicos

Após avaliações realizadas aos 60 dias de cultivo *in vitro*, foram selecionadas 10 plantas de cada tratamento das quais retirou-se a segunda folha expandida. As folhas foram fixadas em FAA₇₀ durante 24 horas, sendo posteriormente conservadas em álcool etílico 70% (Johansen, 1940).

Na caracterização anatômica e medições da espessura foliar (epiderme adaxial, abaxial e mesófilo) em seções transversais do limbo foram extraídos cortes de 0,5 cm² na região mediana das folhas, os quais foram desidratados em série etílica de concentração crescente, diafanizadas em xilol, embebidas e emblocadas em parafina.

Os cortes transversais de 20 µm de espessura foram efetuados em micrótomo rotativo e submetidos ao processo de coloração com o azul de toluidina 0,05% pH 4,0,

conforme metodologia descrita por O'Brien et al. (1981). A montagem final foi feita utilizando-se o Bálsamo do Canadá.

Nas medições da espessura foliar (epiderme adaxial, abaxial e mesofilo) foi utilizado o software ANATI QUANTI (Aguiar et al., 2007).

Para análise anatômica foi realizada a diafanização da epiderme (visualização em vista frontal). Cortes de 0,5 cm² na região mediana das folhas foram diafanizadas em hidróxido de sódio por 30 minutos e, posteriormente, foram lavadas em água destilada e coradas em solução de fucsina por 12 horas. As lâminas foram montadas em Verniz Vitral Gato Preto[®] (Arnott, 1959).

Quantificou-se o número de células epidérmicas, o número de estômatos, a densidade estomática (número de estômatos/mm²) e o índice estomático. O programa utilizado para análise desses dados foi o software ANATI QUANTI (Aguiar et al., 2007).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3 (meio de cultivo x tipos de vedações dos tubos), com 3 repetições por tratamento. O software SISVAR (Ferreira, 2003) foi utilizado para as análises, testando-se as médias pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A captura das imagens, para os dois processos, foi realizada em microscópio óptico com câmera digital acoplada.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivo *in vitro*: Influência da sacarose e do tipo de vedação

Em todos os tratamentos houve o crescimento das brotações formando plântulas que visualmente eram vistosas, bem formadas, não havia formação de calos e nem de raízes. O crescimento das brotações foi dependente do suprimento de sacarose no meio de cultura, entretanto, o tipo de vedação não exerceu influências nas variáveis estudadas (Figura 5.1).

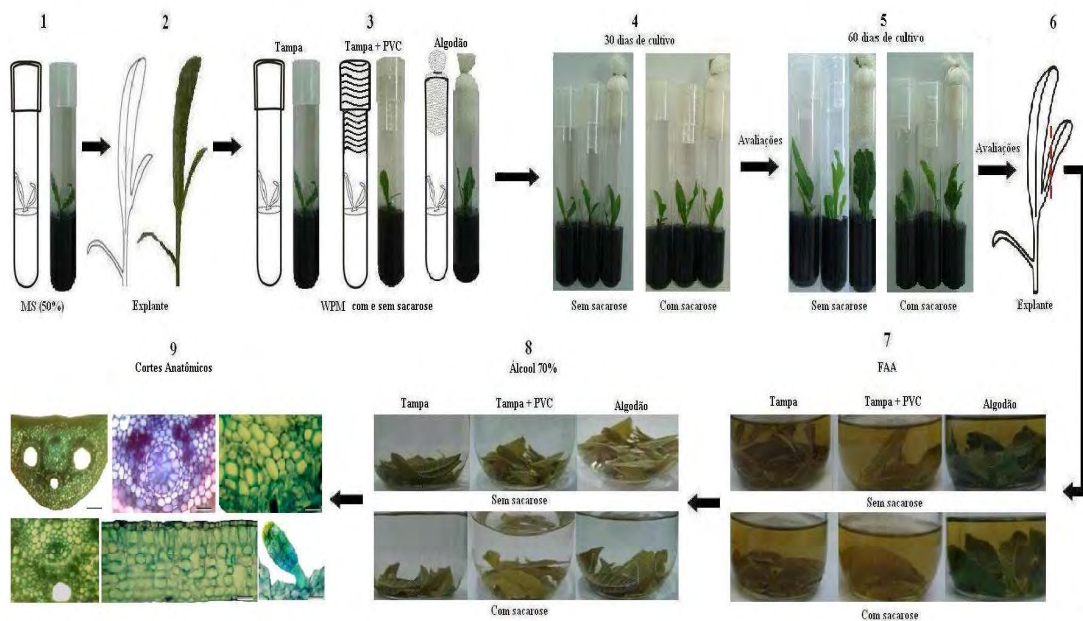


Figura 5.1. Influência da sacarose e da vedação na anatomia foliar de brotações de *A. othonianum* Rizz. cultivados *in vitro*. 1. Explantes preestabelecidos *in vitro*; 2. Explante a ser inoculado; 3. Tipos de vedações usadas; 4. Plântulas aos 30 dias de cultivo *in vitro*; 5. Plântulas aos 60 dias de cultivo *in vitro*; 6. Coleta da segunda folha expandida; 7. Fixação das folhas em FAA; 8. Conservação em álcool 70%; 9. Cortes anatômicos. Rio Verde, GO, 2009.

Nas avaliações realizadas aos 30 dias, verificou-se que não houve interação entre os fatores sacarose x tipos de vedações para as variáveis comprimento de plântulas e de folhas, no entanto, houve influência significativa dessas variáveis com relação a sacarose. É possível verificar na Tabela 5.1 que obteve-se melhores resultados com o seu uso. O comprimento médio de plântulas no meio com sacarose foi de 4,90 cm e o de folhas 2,72 cm. Já os tipos de vedações utilizadas não exerceram influência significativa no comprimento de plântulas e de folhas (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Comprimento médio de plântulas e de folhas de *A. othonianum* Rizz., aos 30 e 60 de cultivo *in vitro*, em função da presença ou ausência de sacarose no meio de cultivo e dos tipos de vedações dos tubos de ensaio. Rio Verde, GO, 2009.

30 dias de cultivo				
Variável (cm)	Vedações	Sacarose (μM)		
		0,00	87,34	Médias
Comprimento de Plântulas	Tampa	4,60	4,90	4,75 a
	Tampa + PVC	4,20	4,66	4,43 a
	Tampão de Algodão	4,52	5,14	4,83 a
Médias		4,44 B	4,90 A	
Comprimento de Folhas	Tampa	2,43	2,72	2,58 a
	Tampa + PVC	2,31	2,61	2,46 a
	Tampão de Algodão	2,48	2,82	2,65 a
Médias		2,41 B	2,72 A	
60 dias de cultivo				
Variável (cm)	Vedações	Sacarose (μM)		
		0,00	87,34	Médias
Comprimento de Plântulas	Tampa	4,32	5,70	5,01 a
	Tampa + PVC	3,98	5,44	4,71 a
	Tampão de Algodão	3,52	6,24	4,88 a
Médias		3,94 B	5,79 A	
Comprimento de Folhas	Tampa	2,61 a B	3,21 a A	2,91 a
	Tampa + PVC	2,53 a A	2,78 a A	2,66 a
	Tampão de Algodão	2,09 a B	3,35 a A	2,72 a
Médias		2,41 B	3,12 A	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, e pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Com relação às avaliações feitas aos 60 dias, houve efeito significativo da interação sacarose x tipos de vedações para a variável comprimento de folhas.

Constatou-se que as plântulas cultivadas em meio com sacarose cujos tubos foram vedados com tampão de algodão e com tampa plástica sem a película de PVC, as folhas eram maiores ao se comparar com os demais tratamentos. Obteve-se médias de 3,35 cm e de 3,21 cm, respectivamente. Nos tubos vedados com tampa plástica e com película de PVC, a presença ou não de sacarose não surtiu efeito (Tabela 5.1). Isoladamente, o uso da sacarose teve efeito significativo: as folhas das plântulas

cultivadas em meio adicionado sacarose cresceu 3,12 cm e as do meio sem sacarose, 2,41 cm. Os tipos de vedações não tiveram efeito significativo (Tabela 5.1).

Quanto ao comprimento de plântulas, não houve influência do tipo de vedações, mas a ausência de sacarose no meio foi extremamente prejudicial. Obteve-se médias de 5,79 cm no meio com sacarose e 3,94 cm no meio sem sacarose (Tabela 5.1).

Pela análise de contraste entre os tratamentos (Tabela 5.2), verifica-se que para variável número de folhas houve efeito significativo somente nas avaliações feitas aos 60 dias, quando contrastado o uso de sacarose com o tipo de vedações. Os tratamentos cujos meios continham sacarose indicaram efeito superior aos tratamentos ausentes de sacarose. Quando o contraste fixado foram os tipos de vedações não se obteve efeito significativo (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Análise de contrastes entre os tratamentos para o número de folhas de *A. othonianum* Rizz., aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, em função da presença ou ausência de sacarose no meio de cultivo e tipos de vedações dos tubos de ensaio. **(S)**= meio com sacarose; **(s/S)**= meio sem sacarose; **(T)**= tampa plástica sem PVC; **(T. PVC)**= tampa plástica com PVC; **(TA)**= tampão de algodão. Rio Verde, GO, 2009.

30 dias de cultivo			
Contrastes	Estimativa	Erro Padrão	Pr(> z)
Número de folhas			
S+T vs s/S+T	0,18	0,15	0,24 ^{n.s}
S+T. PVC vs s/S+T. PVC	0,17	0,16	0,28 ^{n.s}
S+TA vs s/S+TA	0,21	0,15	0,17 ^{n.s}
S+T, S+T. PVC vs S+TA	-0,11	0,12	0,37 ^{n.s}
S+T vs S+T. PVC	0,11	0,15	0,44 ^{n.s}
s/S+T, s/S+T. PVC vs s/S+TA	-0,08	0,14	0,55 ^{n.s}
s/S+T vs s/S+T. PVC	0,11	0,16	0,50 ^{n.s}
60 dias de cultivo			
Contrastes	Estimativa	Erro Padrão	Pr(> z)
Número de folhas			
S+T vs s/S+T	0,42	0,15	0,00*
S+T. PVC vs s/S+T. PVC	0,36	0,16	0,03*
S+TA vs s/S+TA	0,54	0,15	0,00*
S+T, S+T. PVC vs S+TA	-0,09	0,12	0,40 ^{n.s}
S+T vs S+T. PVC	0,23	0,14	0,10 ^{n.s}
s/S+T, s/S+T. PVC vs s/S+TA	0,05	0,15	0,73 ^{n.s}
s/S+T vs s/S+T. PVC	0,16	0,17	0,33 ^{n.s}

*significativo a 5% de probabilidade; ^{NS} não significativo.

A presença de sacarose no meio de cultura foi o fator que mais influenciou as variáveis estudadas. Ainda que muitos autores relatem a possibilidade de plantas se adaptarem às condições fotoautotróficas *in vitro*, mesmo sob as condições artificiais, no cultivo de *A. othonianum* Rizz. a presença da sacarose foi fundamental para uma boa formação das plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues, Melo, Aloufa (2006) em seu trabalho feito com Macieira (*Malus domestica*) no qual os autores relatam a necessidade do uso da sacarose, pois na sua ausência ocorria a morte e o

atrofiamento dos explantes. Da mesma forma, Leite, Finardi, Fortes (2000) em seus estudos realizados com porta-enxerto de Pereira OH X F97 e Costa et al (2009) propagando *in vitro* cultivares de Bananeiras (*Musa spp*) recomendam a utilização da sacarose no meio de cultivo tanto no alongamento como para o enraizamento.

Ao final do segundo subcultivo (60 dias) as plântulas crescidas em meio sem sacarose tinham sinais de deficiência que eram perceptíveis devido à coloração amarela nas folhas. Esses indícios eram mais evidentes nos tubos em que a aeração não estava favorável. 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 frequentemente usadas nas salas de crescimento.

De acordo com Pierik (1987), as tampas de plástico (polipropileno) são as mais utilizadas nos laboratórios por serem desenvolvidas especialmente para trabalhos em cultura de tecidos e por resistirem a elevadas temperaturas, podendo ser autoclavadas sem deformação. Porém, o elevado custo contribui para utilização de outros tipos de tampas, como: papel alumínio, algodão, metal e vedafilme® (PVC). Constatou-se que na propagação *in vitro* de *A. othonianum* Rizz., para a maioria das variáveis, a vedação dos frascos não teve efeito significativo. Mas a utilização de tampa plástica sem PVC e com o tampão de algodão dispõem de vantagens no seu uso por prevenir o ressecamento dos explantes, controlar a contaminação, permitir as trocas gasosas com o ambiente externo e, conseqüentemente, diminuir os gastos na produção final das mudas. Tais vantagens tornam o seu uso sempre aconselhável e vários autores têm destacado essa prática como sendo promissora no estímulo a fotoautotrofia aprimorando a propagação *in vitro* (Nguyen & Kozai, 2001; Santana et al., 2008; Nepomuceno et al., 2009).

Estudos Anatômicos

As mudanças ocorridas nas condições de cultivo revelaram a plasticidade adaptativa nas plântulas de *A. othonianum* Rizz. Houve significantes alterações nas folhas apontadas em todas as variáveis estudadas.

Considerando as avaliações feitas nas células epidérmicas isoladamente, o efeito foi significativo quando se usou o meio sem sacarose. Quanto ao tipo de vedações, o uso de tampa plástica foi mais eficiente. Na interação, o número de células epidérmicas foi maior quando os tubos foram vedados com tampa plástica e tampa plástica com PVC em meio sem sacarose. As folhas dos explantes crescidas em tubos vedados com tampão de algodão estavam mais espessas quando no meio havia sacarose. Este comportamento foi observado tanto para as células da epiderme da face adaxial quanto para a abaxial (Tabela 5.3).

O número de estômatos e a densidade estomática tiveram o mesmo comportamento na face adaxial das folhas. A ausência de sacarose no meio elevou a formação e a densidade de estômatos, sendo significativamente maior quando comparado com o meio com sacarose. Da mesma forma, os tubos vedados com tampa plástica foram os que proporcionaram maiores números e densidade de estômatos. Na interação, quando os tubos foram vedados com tampa plástica e PVC, a ausência ou presença de sacarose não influenciou na formação e nem na densidade dos estômatos. Os tubos vedados com tampa plástica e tampão de algodão tiveram maior número e densidade de estômatos em meio sem sacarose (Tabela 5.3).

Na face abaxial, quanto ao efeito isolado, o meio sem sacarose também foi significativamente melhor, assim como a tampa plástica. A tampa plástica com película de PVC vedando os tubos contendo meio sem sacarose produziu plântulas cujas folhas tinham número e densidade maior de estômatos. O contrário ocorreu quando utilizado o tampão de algodão e o meio com sacarose, onde se obteve maior número e densidade de estômatos. Nos tubos vedados com tampa plástica, tanto no meio com quanto no meio sem sacarose, a formação e a densidade de estômatos mantiveram-se similar (Tabela 5.3).

Da mesma forma, nas avaliações do índice estomático, na face adaxial, isoladamente a ausência da sacarose induziu maiores índices e quanto ao tipo de tampas, os maiores índices foram com a tampa plástica. Na interação, a tampa plástica e o tampão de algodão tiveram maiores índices estomáticos quando o meio estava sem sacarose. Os tubos vedados com tampa e PVC o uso ou não da sacarose não surtiu

efeito. Na face abaxial, a utilização ou não de sacarose no meio não ocasionou diferenças significativas e o uso da tampa plástica teve o melhor índice estomático. Os tubos quando vedados com tampa plástica e o tampão de algodão contendo meio adicionado de sacarose, obtiveram índices estomáticos superiores com relação ao meio sem sacarose. O contrário foi observado quando utilizado tampa plástica e PVC no meio sem sacarose (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Médias do número de células epidérmicas, número de estômatos, densidade estomática (mm²) e índice estomático (%) em folhas de *A. othonianum* Rizz. cultivados *in vitro*, para face adaxial e abaxial, em função da presença ou ausência de sacarose no meio e diferentes tipos de vedações dos tubos de ensaio. Rio Verde, GO, 2009.

ANATOMIA	Face Adaxial			Face Abaxial		
	Sacarose (µM)			Sacarose (µM)		
	0,00	87,34	Médias	0,00	87,34	Médias
Vedações	Nº de Células epidérmicas			Nº de Células epidérmicas		
Tampa	483,0 a A*	361,0 a B	422,0 a	471,7 a A	357,0 a B	414,3 a
Tampa + PVC	244,3 b A	200,3 c B	222,3 c	333,7 b A	203,7 b B	268,7 c
Tampão de Algodão	265,3 b B	320,0 b A	292,7 b	287,7 b B	371,3 a A	329,3 b
Médias	330,9 A	293,8 B		364,3 A	310,7 B	
	Nº de Estômatos			Nº de Estômatos		
Tampa	45,0 a A	16,0 a B	30,5 a	62,7 a A	60,3 a A	61,5 a
Tampa + PVC	10,7 b A	10,3 b A	10,6 b	62,0 a A	17,7 c B	39,8 b
Tampão de Algodão	14,0 b A	7,0 b B	10,6 b	28,0 b B	51,3 b A	39,8 b
Médias	23,2 A	11,1 B		50,9 A	43,2 B	
	Densidade estomática (mm²)			Densidade estomática (mm²)		
Tampa	728,9 a A	259,2 a B	494,0 a	1015,0 a A	979,9 a A	997,5 a
Tampa + PVC	242,7 b A	167,4 b A	205,0 b	1004,2 a A	286,2 c B	645,2 b
Tampão de Algodão	226,8 b A	135,2 b B	180,9 b	453,5 b B	836,9 b A	645,2 b
Médias	399,4 A	187,3 B		824,3 A	700,9 B	
	Índice Estomático (%)			Índice Estomático (%)		
Tampa	8,5 a A	4,3 a B	6,4 a	11,7 b B	14,5 a A	13,1 a
Tampa + PVC	4,2 b A	4,9 a A	4,5 b	15,7 a A	8,0 c B	11,9 b
Tampão de Algodão	5,0 b A	2,2 b B	3,6 c	8,9 c B	12,3 b A	10,6 c
Médias	5,9 A	3,8 B		12,1 A	11,6 A	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, e pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Para a espessura foliar verificou-se que, tanto os fatores isolados quanto a interação sacarose x vedações, houve significância apenas para espessura do mesofilo (Tabela 5.4). A maior espessura foi observada nos tubos vedados com tampão de algodão e presença de sacarose no meio de cultura.

Tabela 5.4. Espessura da epiderme face adaxial e abaxial e mesofilo (μm) em folhas de *A. othonianum* Rizz. cultivados *in vitro*, em função da presença ou ausência de sacarose no meio e diferentes tipos de vedações dos tubos de ensaio. Rio Verde, GO, 2009.

Variável (μm)	Vedações	Sacarose (μM)		
		0,00	87,34	Médias
Espessura Epiderme Face Adaxial	Tampa	26,9 a A*	25,9 a A	26,3 a
	Tampa + PVC	24,2 a A	25,4 a A	24,3 a
	Tampão de Algodão	31,6 a A	25,0 a A	28,3 a
Médias		27,6 A	25,4 A	
Espessura Epiderme Face Abaxial	Tampa	24,8 a A	29,4 a A	27,1 a
	Tampa + PVC	25,7 a A	23,8 a A	24,7 a
	Tampão de Algodão	29,5 a A	25,7 a A	27,6 a
Médias		26,6 A	26,3 A	
Espessura Mesofilo	Tampa	195,1 b A	156,0 c B	175,6 b
	Tampa + PVC	163,4 b B	229,3 b A	196,3 b
	Tampão de Algodão	238,7 a B	290,1 a A	264,4 a
Médias		199,0 B	225,1 A	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, e pela mesma letra minúscula, em cada coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Quanto às características anatômicas, em todos os tratamentos constatou-se que as folhas estudadas são revestidas por epiderme unisseriada com cutícula delgada, anfihipoestomáticas e os estômatos, do tipo paracíticos, estão inseridos no mesmo nível das células circunvizinhas (Figura 5.2). O mesofilo é homogêneo com células isodiamétricas a ovaladas de organização dorsiventral. O clorênquima possui uma camada de parênquima paliçádico com células justapostas e diversas camadas de parênquima esponjoso, representado por células com formas variadas e espaços intercelulares discretos (Figura 5.3-E).

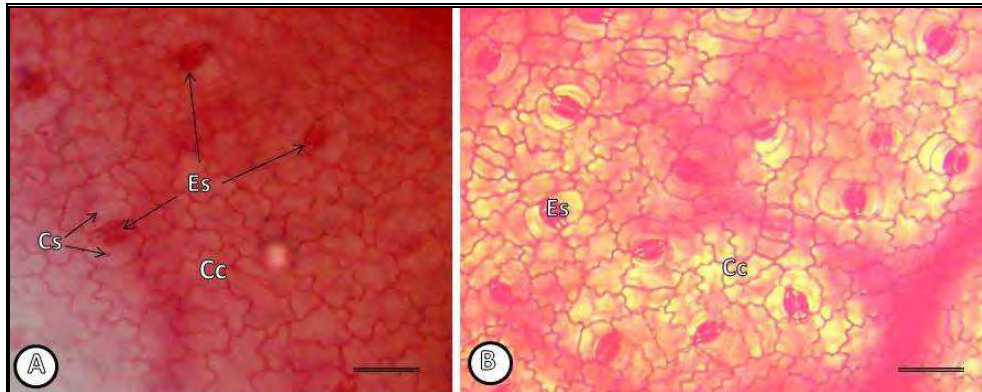


Figura 5.2. Vista frontal de folhas de *A. othonianum* Rizz. cultivados *in vitro*. **A.** face adaxial; **B.** face abaxial. **Cc.** Célula comum, **Cs.** Célula subsidiária, **Es.** Estômatos. Barras= 50 μm. Rio Verde, GO, 2009.

Em secção transversal, a nervura é biconvexa, e logo abaixo da epiderme observa-se o parênquima fundamental com três a cinco feixes vasculares colaterais em arranjo cêntrico (Figura 5.3-A, C e D). Associado ao floema encontra-se canais secretores (Figura 5.3-D), característica marcante da família Anacardiaceae, reportados por Nascimento-Silva & Paiva (2007) em seus estudos, nos quais foram relatados a presença de canais secretores de látex ou ductos resiníferos associados ao floema em *Spondias tuberosa* Arruda. Nas duas faces da folha de *A. othonianum* Rizz. foram observados tricomas glandulares multicelulares com pedúnculo (Figura 5.3-F).

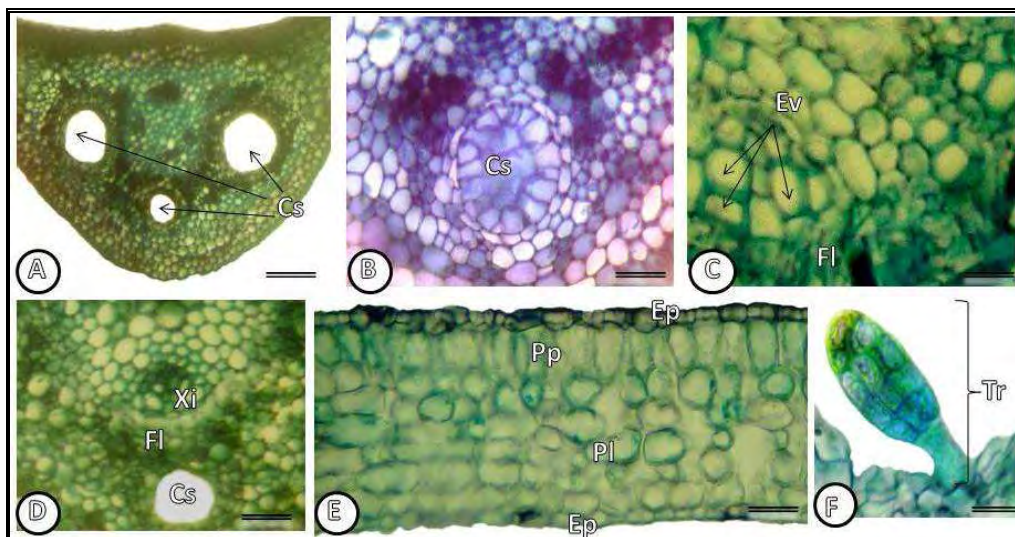


Figura 5.3. Seções transversais de folhas de *A. othonianum* Rizz. cultivadas *in vitro*. **Cs:** Canal secretor, **Ep:** epiderme, **Ev:** elemento de vaso, **Fl:** floema, **Pl:** parênquima esponjoso, **Pp:** parênquima paliádico, **Tr:** Tricoma, **Xi:** Xilema. Barras: A: 100 μm; A-F: 50 μm. Rio Verde, GO, 2009.

Folhas das plantas cultivadas *in vitro* geralmente são finas, tenras e pouco ativas fotossinteticamente (Pierik, 1990), suas estruturas são mal formadas no mesófilo que é pouco diferenciado (Hazarika, 2006). A cutícula é pouco desenvolvida (Rodrigues, Melo, Aloufa, 2006; Fráguas, 2003), a cavidade estrutural dos estômatos são pequenas (Donnelly & Vidaver, 1984) e o número de tricomas reduzidos (Fideles, 2000). Também tem sido relatado o aumento tanto da espessura da folha como na densidade estomática (Abbade et al., 2009; Nascimento-Silva & Paiva, 2007). Segundo Abbade et al. (2009), altos índices estomáticos induzem perdas de água nas plantas e, diminuindo sua densidade, diminui a perda de água e possibilita a sobrevivência em condições de estresse hídrico. Por isso, altos índices estomáticos na fase de aclimatização são desfavoráveis. Além disso, existe uma tendência em se ter células do parênquima paliçádico menores e em menor quantidade do que as do parênquima esponjoso (Toma et al., 2004; Pierik, 1990).

Tais afirmativas corroboram com os resultados obtidos neste trabalho. Para todas as variáveis analisadas, com relação às avaliações de quantificações anatômicas, verifica-se que os índices obtidos sempre foram maiores quando não havia estímulo fotoautotrófico. Quando propiciado o estímulo, os índices tenderam a cair, evidenciando as mudanças ocorridas na anatomia das plântulas cultivadas sob esse processo, tornando-as mais próximas da condição em que elas crescem *in vivo*. Com base nas avaliações das características anatômicas, pode-se afirmar que os tubos vedados com tampão de algodão permitem que as brotações de *A. othonianum* Rizz. se ajustem as condições de fotoautotrofismo, proporcionando maior sucesso nas etapas subsequentes que são o enraizamento e a aclimatização. Resultados semelhantes foram obtidos por Santana et al (2008) em estudos realizados com *Annona glabra* L. e por Cruzzuol et al (1995), em seus estudos com cravo (*Dianthus caryophyllus* L.).

5.4 CONCLUSÕES

A sacarose e o tampão de algodão influenciam na plasticidade adaptativa das plântulas *A. othonianum* Rizz. produzidas *in vitro*. A utilização destes geram condições satisfatórias para a fase anterior à aclimatização.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M.; CENTOFANTE, A. R.; OLIVEIRA, C. Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.

AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A. A. e FERREIRA, R.S. Anati quanti: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 649-659, 2007.

ARNOTT, H. J. Leaf clearings. **Turttox news**, v. 37, n. 8, p. 192-194, 1959.

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. 03-311, 2009.

CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L.A.; DE ALMEIDA, M.; CROCOMO, O.J. Controle da Vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v. 52 n. 3, p. 604-614, 1995.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. The anatomy of tissue cultured raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 43-50, 1985.

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. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.

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

FIDELIS, I.; CASTRO, E. M. C.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brossimum gaudichaudii* TRÉC. desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 327-336, 2000.

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**, Hague, n. 748, p. 77-86, 2007.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 105-120, 2006.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **McGraw-Hill Book Co. Incl.** New York, p. 523, 1940.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeito de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta encherto de Pereira OH x F97 **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 335-357, 2000.

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

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

NASCIMENTO-SILVA, O.; PAIVA, J. G. A. de. Estudos morfológicos e anatômicos em folhas adultas de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindley). **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 6, n. 2, p. 36-43, 2007.

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

NGUYEN, Q.T.; KOSAI, T. Photoautotrophic micro-propagation of woody and tropical plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, n.4, p.525-537, 2001.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. The study of structure principles and selected methods. **Termarcaphi Pty Ltd**, Melbourne, p. 45. 1981.

PIERIK, R.L.M. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of higher plants**. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishing, 1987. 344. Closure of test tubes and flasks, p.83-85.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, [S.l.], Praha, v. 42, p. 481-497, 1999.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2009.

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.

SANTANA, J. R. F. de; OLIVEIRA, L. M. de; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. D. Anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, 2008.

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.

SOUZA, C. M.; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, B. M.; MORAIS, A.R.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 830-835, 1999.

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.

TOMA, I.; CONSTANTINE, T.; GHIORGHITA, G. Histo-anatomy and *in vitro* morphogenesis in *Hyssopus officinalis* L. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, v. 63, n. 1, p. 59-68, 2004.

VALLE FIHO, G.M. Cerrado: Desenvolvimento auto-sustentável. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 3, 1991.