

INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E DO TIPO DE EXPLANTE NA MORFOGÊNESE *in vitro* DE *Hancornia speciosa* Gomes



Influence of growth regulators and explant type on in vitro morphogenesis of Hancornia speciosa Gomes

Influencia de reguladores de crecimiento y tipo de explante en la morfogénesis in vitro de Hancornia speciosa Gomes

Artigo Original
Original Article
Artículo Original

Kívia Soares de Oliveira^{1*}, Fúlvio Aurélio de Moraes Freire², Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa³

¹ Doutoranda em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brasil.

² Professor do Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brasil.

³ Professor do Departamento de Botânica e Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, Brasil.

*Correspondência: Departamento de Botânica e Zoologia/DBZ– Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. CEP: 59072-970. E-mail: kiviaoliv@yahoo.com.br

Artigo recebido em 30/01/2019 aprovado em 07/10/2019 publicado em 04/12/2019.

RESUMO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), pertencente à família Apocynaceae, é uma espécie nativa do Cerrado e dos tabuleiros costeiros do Nordeste, e possui grande importância socioeconômica, ambiental e cultural. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB) e do tipo de explante sobre a morfogênese *in vitro* de *H. speciosa*. Para isso, explantes nodais e apicais foram inoculados em meio MS básico e em MS suplementado com 1,5; 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ de BAP e 1,25; 2,5 e 3,0 mg L⁻¹ de AIB. As variáveis observadas foram: formação de brotos, número de brotos por explante, número de nós por brotação, contaminação, sobrevivência, formação de raízes, número médio de raízes e presença de calos. Constatou-se que explantes de ápices caulinares, na ausência de BAP, apresentam-se mais responsivos em relação à taxa de multiplicação *in vitro* e indução de brotações. A rizogênese a partir de ápices caulinares e segmentos nodais não foi favorecida nas concentrações de AIB utilizadas. Entretanto, o uso de 3,0 mg.L⁻¹ de AIB induz a formação de maior número de raízes, aumenta a calogênese e sobrevivência de segmentos nodais e apicais de *H. speciosa*.

Palavras-chave: Apocynaceae; citocinina; auxina.

ABSTRACT

Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), belonging to the family Apocynaceae family, is a native species of the Cerrado and the Northeast coastal plains, and has great socio-economic, environmental and cultural importance. The objective of this study was to evaluate the influence of different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) and indole butyric acid (AIB) on the *in vitro* morphogenesis of *H. speciosa*. For this, apical and nodal explants were inoculated into basic MS medium and into MS medium supplemented with 1.5; 2.5 and 3.5 mg L⁻¹ BAP to 1.25; 2.5 and 3.0 mg L⁻¹ of AIB. The variables observed were: sprout formation, number of shoots per explant, number of nodes per shoot, contamination, survival, root formation, mean number of roots and callus presence. It was found that explants of shoot apices in the absence of BAP were more responsive in relation to the rate of *in vitro* multiplication and induction of shoots. Rhizogenesis from shoot apices and nodal segments was not favored in the IBA concentrations used. However, the concentration of 3.0 mg L⁻¹ AIB induces the formation of more roots, increases calogênese and survival of nodal and apical segments of *H. speciosa*.

Keywords: Apocynaceae; cytokinin; auxin.

RESUMEN

La mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), perteneciente a la familia Apocynaceae, es una especie nativa del Cerrado y de los tableros costeros del Nordeste, y posee gran importancia socioeconómica, ambiental y cultural. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) y tipo de explante sobre la morfogénesis *in vitro* de *H. speciosa*. Para ello, explantes nodales y apicales fueron inoculados en medio MS básico y en MS suplementado con 1,5; 2,5 y 3,5 mg L⁻¹ de BAP y 1,25; 2,5 y 3,0 mg L⁻¹ de AIB. Las variables observadas fueron: formación de brotes, número de brotes por explante, número de nodos por brotación, contaminación, supervivencia, formación de raíces, número medio de raíces y presencia de callos. Se constató que explantes de ápices caulinares sin adición de BAP, se presentan más responsivos en relación a la tasa de multiplicación *in vitro* e inducción de brotes. La rizogénesis a partir de ápices caulinares y segmentos nodales no fue favorecida en las concentraciones de AIB utilizadas. Sin embargo, el uso de 3,0 mg L⁻¹ de AIB induce la formación de mayor número de raíces, aumenta la calogénesis y la supervivencia de segmentos nodales y apicales de *H. speciosa*.

Descriptores: Apocynaceae; citoquinina; auxina.

INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), pertencente à família Apocynaceae, é uma espécie frutífera nativa do Brasil, cuja distribuição ocorre nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte dos Cerrados, até os Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas do Nordeste (VIEIRA et al., 2017). É bastante conhecida pelo sabor e valor nutritivo dos frutos, podendo ser consumidos tanto *in natura* como na forma processada (sucos, polpas, geleias e sorvetes, dentre outros) (OLIVEIRA et al., 2014). Nos últimos anos, o interesse econômico e científico por esta espécie tem aumentado, sobretudo, devido à comercialização de seus frutos e extração de compostos naturais com alto potencial farmacológico (ALMEIDA et al., 2016). No aspecto ambiental, é adequada para recuperação de áreas degradadas, além de manter relações ecológicas, uma vez que é espécie dispersada pela fauna.

Embora a mangabeira se destaque pela sua valoração socioeconômica, medicinal e ecológica, a espécie vem sofrendo grandes impactos antrópicos nas últimas décadas. Ações como a intensa expansão imobiliária nas áreas de ocorrência natural, turismo, práticas de monoculturas (cana-de-açúcar e coqueiro), extrativismo exploratório, além das queimadas, vêm

contribuindo para a redução da diversidade genética da espécie, ameaçando-a de extinção (SÁ et al., 2011). Além disso, apresenta dificuldades de propagação em ambiente natural devido à recalcitrância das sementes, caracterizada pela rápida desidratação do embrião, e a polpa do fruto ter ação inibitória sobre o processo germinativo (SOARES et al., 2015). Assim, torna-se evidente a necessidade de desenvolver alternativas sustentáveis que viabilizem tanto a sua recomposição em ambiente natural, quanto à conservação de seus genótipos (BEZERRA et al., 2014).

Frente a isso, uma estratégia que vem sendo considerada promissora, para reverter esse processo, é a técnica de micropropagação *in vitro*, que constitui uma excelente via de conservação para espécies como a mangabeira, já que visa à produção de mudas em larga escala e com qualidade fitossanitária. Essa técnica pode ser empregada na formação de bancos de germoplasma para futuras pesquisas, estudos de reposição de mata nativa, implantação de cultivos comerciais e paisagismo (OLIVEIRA et al., 2014).

O sucesso da micropropagação pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles, a variação genotípica, o tipo e o tamanho do explante, o meio de cultura, o tipo e as concentrações de

reguladores de crescimento, sendo estes, os principais controladores da morfogênese *in vitro* (DIAS et al., 2001). Nesse aspecto, o balanço dos fitorreguladores mais utilizados no crescimento e morfogênese *in vitro*, auxina e citocinina, exerce diversos efeitos na diferenciação de parte aérea, raízes e formação de calos (REIS et al., 2004). As citocininas estimulam a divisão celular e estão associadas à diferenciação celular no desenvolvimento das partes aéreas e raízes, e as auxinas controlam o crescimento e alongamento celular, sobretudo, na promoção de raízes laterais e adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Dentre as citocininas, a mais utilizada para esses fins é a 6-benzilaminopurina (BAP), pois, dentro dessa classe, é o fitorregulador que tem se mostrado mais efetivo na multiplicação de diversas espécies lenhosas, proporcionando ainda, o menor custo de aquisição (ARAGÃO et al., 2011). Para o enraizamento, a auxina mais utilizada é o ácido indolbutírico (AIB), devido à sua baixa fitotoxicidade aos explantes, proporcionando resultados positivos a rizogênese (OLIVEIRA et al., 2013).

Por outro lado, diferentes tipos de explantes podem ser utilizados para iniciar o cultivo *in vitro*. Ápices caulinares e segmentos nodais são bastante empregados nos processos de micropropagação, pela facilidade de obtenção, pelo número inicial de explantes isolados da planta matriz, pela viabilidade *in vitro* e rápido crescimento (FLORES et al., 2011). A grande vantagem desses tipos de explantes é que por envolver órgãos meristemáticos primordiais, proporciona maior estabilidade genética das plantas micropropagadas (FARIA et al., 2007).

Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a influência de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido

indolbutírico (AIB) e tipo de explante sobre a morfogênese *in vitro* de *H. speciosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Indução de brotações *in vitro*

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Conservação de Espécies Nativas (LABCEN), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A indução de brotações foi realizada utilizando como explantes segmentos nodais e ápices caulinares, provenientes de plântulas germinadas *in vitro*, com idade fisiológica de 60 dias. Os segmentos foram excisados com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e inoculados verticalmente em frascos de vidro com capacidade de 150 mL, contendo 20 mL de meio de cultura. O meio basal foi o MS básico (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 100 mg L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,5; 2,5 e 3,5 mg L⁻¹). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 ± 0,2 e, posteriormente, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C e pressão de 1,2 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os ensaios foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 60 μmol.m⁻²s⁻¹. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por oito tratamentos, constituído por três repetições. Por repetição, os tratamentos continham 10 unidades experimentais (10 frascos). Cada unidade experimental era constituída por um único explante (nodal ou ápice caulinar). Após 30 dias da inoculação foram avaliados: explantes responsivos para a formação de brotos, o número de brotos por explante,

número de nós por brotação adventícia, sobrevivência e contaminação.

Os dados obtidos foram submetidos a quatro análises de modelo linear generalizado (PAREDES et al., 2014), uma para cada Variável Dependente (V.D.), denominadas brotação, número de brotos/explante, número de nós por brotação, contaminação e sobrevivência. As V.D. foram ajustadas com as concentrações das Variáveis Independentes (V.I.), BAP e explante (nodal e apical), utilizando-se o software R, versão 3.2.2 (2013). As V.D. com distribuição binomial (brotação, contaminação e sobrevivência) foram ajustadas a partir da função de ligação Logit (modelo de regressão logística). No caso das V.D. número de brotos e número de nós por brotação, por serem formados por variáveis quantitativas discretas (distribuição de Poisson), ajustou-se ao modelo log-linear (modelo de regressão de Poisson). Foi utilizado, nos modelos, o nível de significância (α) de 5%.

Enraizamento *in vitro*

Para o enraizamento *in vitro*, foram utilizados como explantes segmentos nodais e ápices caulinares de plântulas assépticas germinadas *in vitro* com idade fisiológica de 60 dias. Os segmentos foram excisados com 1,0 cm de comprimento e inoculados verticalmente em frascos de vidro com capacidade de 150 mL, contendo 20 mL de meio de cultura. O meio basal foi o MS básico (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 100 mg L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,0; 1,25; 2,5 e 3,0 mg L⁻¹).

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C de temperatura e na ausência de luz, por 19 dias. Decorrido esse período, foram

transferidos para meio MS básico sem adição de regulador de crescimento. Após 30 dias de inoculação, foram avaliadas as seguintes variáveis: explantes responsivos para formação de raízes, número médio de raízes, formação de calos e sobrevivência. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado composto por oito tratamentos, constituído por três repetições. Por repetição, os tratamentos continham 10 unidades experimentais (10 frascos). Cada unidade experimental era constituída por um único explante (nodal ou ápice caulinar).

As variáveis com distribuição binomial (enraizamento, formação de calos e sobrevivência) foram ajustadas a partir da função de ligação Logit (modelo de regressão logística). Com relação ao número médio de raízes, por ser formado por variável quantitativa discreta (distribuição de Poisson), foi ajustado ao modelo log-linear (modelo de regressão de Poisson). Neste caso, foi detectada sobre dispersão dos dados, utilizando-se, desta forma, um modelo quasipoisson. Foi utilizado, nos modelos, o nível de significância (α) de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de brotações *in vitro*

Os modelos utilizados para a análise estatística da formação de brotações, número de brotos por explante, número de nós por brotação, presença de contaminação e taxa de sobrevivência, foram significativos ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de BAP e o tipo de explante, com exceção da variável sobrevivência, que foi significativo apenas para a utilização de BAP (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativas dos parâmetros dos modelos ajustados para exprimir a relação entre as concentrações de BAP e tipo de explante em *H. speciosa*.

	Brot. <i>Logistic</i> (1)	Cont. <i>Logistic</i> (2)	Sob. <i>Logistic</i> (3)	NB <i>Poisson</i> (4)	N. nós/Brot. <i>Poisson</i> (5)
BAP	-0,387*** (0,127)	0,539*** (0,182)	-0,689*** (0,211)	-0,161*** (0,048)	-0,236*** (0,056)
Explante Nodal	-1,637*** (0,334)	0,822* (0,420)	-0,183 ^{ns} (0,428)	0,218* (0,125)	-0,935*** (0,162)
Constante	2,686*** (0,401)	-3,595*** (0,571)	3,778*** (0,639)	0,238** (0,120)	0,514*** (0,119)
Observações	240	240	240	240	240
Log Likelihood	-123,970	-83,361	-75,414	-300,957	-267,195
Crit. Inf. Akaike	253,940	172,722	156,829	607,915	540,391

Nota: ns=não significativo; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Houve maior porcentagem de brotação na ausência de BAP e em explantes de ápices caulinares (Fig. 1A). No tratamento sem BAP, a taxa de brotação foi de 93,33% para explantes apicais, enquanto que, para explantes nodais, foi inferior a 80%. Foi possível observar ainda, um decréscimo na taxa de brotação, conforme o aumento da concentração desse regulador de crescimento, tanto em ápices caulinares como em segmentos nodais. Já em relação ao número de brotos por explante (NB), constatou-se que a adição do fitoregulador reduziu significativamente a média de brotações multiplicadas por explantes nodais e ápices caulinares, à medida que aumentou a concentração de BAP no meio de cultura (Fig. 1B). Na ausência de BAP, o maior número de brotos formados foi verificado em segmentos nodais (1,6 brotos/explante), diferindo significativamente dos segmentos apicais (1,3 brotos/explante).

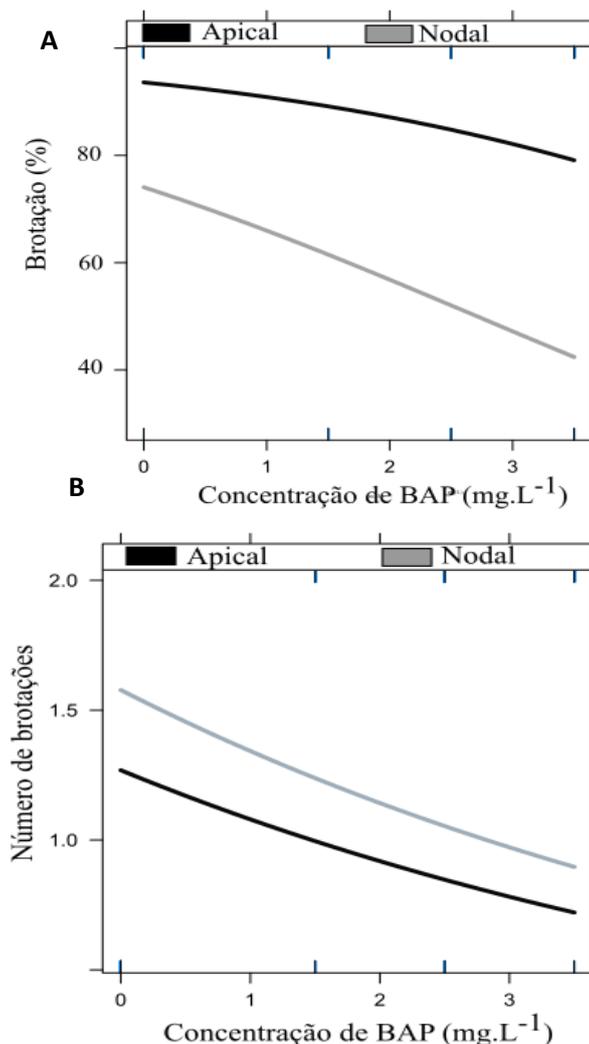
A formação de brotos ocorreu em todas as concentrações utilizadas do fitoregulador BAP,

inclusive na ausência, o que indica a existência de concentrações endógenas de citocinina suficientes para induzir a brotação em segmentos nodais e ápices caulinares de *H. speciosa*. Pode-se inferir que a adição de BAP ao meio de cultura não é benéfica à multiplicação *in vitro* dessa espécie, já que reduziu a taxa de explantes formados e o número de brotações por explante. Logo, apesar da utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o excesso pode gerar efeitos tóxicos e interferir negativamente na organogênese dessa espécie. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2016) em estudos com a mesma espécie.

Os resultados deste trabalho diferem dos obtidos por Soares et al. (2007), ao constatarem que a adição de BAP ao meio de cultura induziu maior formação de brotos em segmentos caulinares de mangabeira, utilizando concentrações de até 5,0 mg L⁻¹ de BAP; e Reis (2011) verificou a eficiência do BAP na indução de multibrotações em microestacas de

mangabeira, sendo observada a presença de brotações mais desenvolvidas na concentração de 3,0 mg L⁻¹, porém essa concentração também induziu a formação de calos na base dos explantes.

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a indução de brotos (A) e o número de brotações por nó (NB) (B) em segmentos nodais e apicais de *H. speciosa*.



Em estudos com a mesma espécie, Silva (2010) verificou que os explantes de ápices caulinares se mostraram mais eficientes na indução da organogênese *in vitro* que as gemas laterais. A variação nas respostas em relação à morfogênese *in vitro* de *H. speciosa*, entre os diferentes níveis de citocinina e na ausência deste fitorregulador, possivelmente estar relacionada à variabilidade

genética da espécie quando propagada por meio de sementes, já que por ser uma planta alógama e de polinização cruzada, resulta em alto grau de diversidade de muitas características, o que justifica as diferentes respostas encontradas para a mesma espécie.

Vale salientar ainda que o fato de os ápices caulinares terem apresentado melhor resposta em relação à taxa de brotação, quando comparado aos segmentos nodais, corrobora com Torres et al. (1998), ao afirmarem que gemas apicais geralmente apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares, embora estas sejam mais utilizadas, por ocorrerem em maior quantidade na planta matriz. As diferentes respostas observadas nos dois tipos de explantes, provavelmente foram devido ao balanço hormonal endógeno presente no tecido vegetal e também em razão da síntese de auxina, que ocorre principalmente nos ápices caulinares, exercer efeitos de dominância apical durante seu transporte do ápice para a base (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em relação ao número de brotos por explante (NB), resultados diferentes foram encontrados por Reis (2011) que ao trabalhar com segmentos caulinares de mangabeira, observou a menor média de brotações multiplicadas na ausência de BAP (1,2 brotos/explante) e na concentração de 4,0 mg L⁻¹ de BAP (1,46 brotos/explante). Em contrapartida, Soares et al. (2011) obtiveram valores superiores para explantes caulinares de mangabeira quando foram tratados com 2,0 mg L⁻¹ de BAP em meio de cultivo WPM. As diferentes respostas ao tipo de explante e ao fitorregulador, corroboram com Brum et al. (2002) ao afirmarem que a multiplicação de brotações com BAP pode estar relacionada a influência da variação genética da planta matriz e do regulador vegetal utilizado para o auxílio na divisão celular e na quebra

de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical.

Quanto ao parâmetro número médio de nós por brotação adventícia (Figura 2A), constatou-se que a adição do fitorregulador ao meio de cultura reduziu significativamente as médias desta variável, tanto em explantes de ápices caulinares, quanto em segmentos nodais. A maior média de nós formados foi obtida na ausência de BAP, sendo os ápices caulinares (1,7 nós/explante) significativamente superiores em relação aos explantes nodais (0,7 nós/explante). Os resultados encontrados indicam que o aumento na concentração de BAP promove um menor alongamento das plantas durante a proliferação *in vitro* desta espécie. Reis (2011) ao estudar a mesma espécie verificou a média de 9,5 nós/explante em microestacas de mangabeira utilizando o meio WPM suplementando com 3,0 mg L⁻¹ de BAP.

Verificou-se maior taxa de contaminação na presença de BAP (Fig. 2B). No tratamento com 3,5 mg L⁻¹ de BAP, a porcentagem de contaminação em explantes nodais foi de 30%, enquanto que, para explantes apicais, foi de 15%. Observou-se ainda, um aumento na taxa de contaminação, conforme o aumento da concentração da citocinina. Os resultados corroboram com os de Oliveira et al. (2016) que também constataram uma tendência a maiores índices de contaminação com o aumento na concentração de BAP em explantes de *H. speciosa*. Isso sugere que concentrações elevadas da citocinina, possivelmente apresentaram efeito tóxico, interferindo na multiplicação e desenvolvimento do explante e, conseqüentemente, contribuindo para sua degradação.

Tais condições podem ter propiciado a proliferação de microrganismos endofíticos que passaram a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultivo (PIOTTO, 2013).

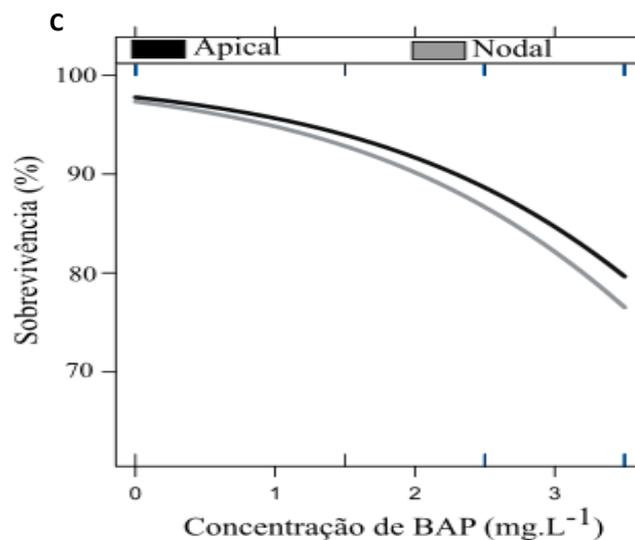
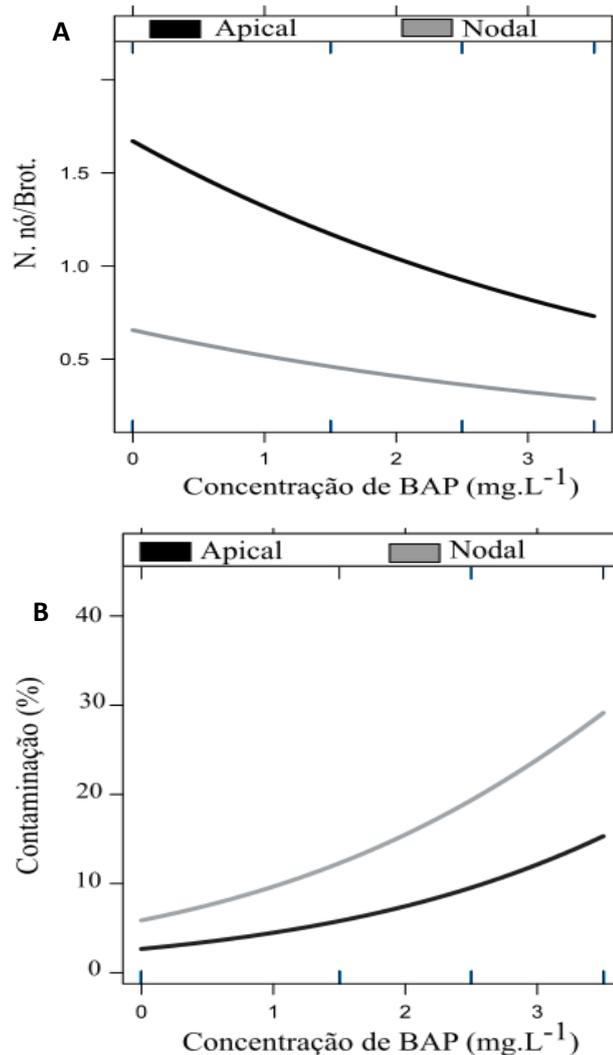
Outro fator que pode ter favorecido a presença desses contaminantes endógenos pode estar relacionado à exsudação de látex, característico da mangabeira e que provavelmente seja uma importante fonte de microrganismos (OLIVEIRA et al., 2016).

Golle et al. (2013) em estudos com a espécie lenhosa *Eugenia involucrata* DC., verificaram que a contaminação em explantes nodais foi superior aos ápices caulinares. Conforme os autores, isso se deve ao fato de que tecidos mais jovens, menos lenhosos, estão menos tempo expostos ao ambiente e dificilmente apresentam contaminações endógenas. Nesse aspecto, as plantas lenhosas, que contemplam grande parte das frutíferas, inclusive a mangabeira, têm grandes dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente devido à contaminação e oxidação, o que constitui um dos desafios da micropropagação que visa à obtenção de plântulas com qualidade fitossanitária (SILVA, 2010).

Quanto à porcentagem de sobrevivência, a resposta foi similar para segmentos nodais e apicais, diminuindo a sobrevivência, conforme o aumento das concentrações de citocinina. Houve maior taxa de sobrevivência na ausência de BAP (98%), independente do tipo de explante (Figura 2C). De maneira geral, o BAP diminuiu o percentual de sobrevivência dos explantes de *H. speciosa*, principalmente na concentração de 3,5 mg L⁻¹. Moraes et al. (2014) ao testarem as concentrações de 0,0 a 4,0 mg L⁻¹ de BAP, verificaram que o aumento na concentração deste fitorregulador favoreceu a sobrevivência dos explantes. Isso provavelmente está relacionado com a capacidade da citocinina de controlar a expressão de genes envolvidos na senescência de tecidos e órgãos vegetais, inibindo-os ou retardando os efeitos fisiológicos degenerativos, e

consequentemente, aumentando a longevidade celular (MORGANTE e LOMBARDI, 2004).

Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre o número médio de nós por brotação (A), a taxa de contaminação (B) e a taxa de sobrevivência (C) em segmentos nodais e apicais de *H. speciosa*.



Enraizamento *in vitro*

Os modelos utilizados para a análise estatística de número médio de raízes por explante, formação de calos e sobrevivência foram significativos para os tratamentos suplementados com AIB, exceto para o tipo de explante, que foi significativo apenas para a variável sobrevivência (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros dos modelos ajustados para exprimir a relação entre as concentrações de AIB e o tipo de explante em *H. speciosa*.

	Enraiz. <i>Logistic</i> (1)	N raiz <i>Quasipoisson</i> (2)	F calos <i>Logistic</i> (3)	Sob. <i>Logistic</i> (4)
AIB	0.210 ^{ns} (0.137)	0.299 ^{**} (0.144)	1.435 ^{***} (0.171)	0.673 ^{***} (0.177)
Exp. Nodal	0.475 ^{ns} (0.311)	0.187 ^{ns} (0.304)	-0.056 ^{ns} (0.335)	-1.029 ^{**} (0.418)
Constant	-1.812 ^{***} (0.345)	-1.131 ^{***} (0.372)	-2.298 ^{***} (0.381)	1.519 ^{***} (0.377)
Observações	240	240	240	240
Log Likelihood	-127.995	-	-111.415	-84.975
Crit. Inf. Akaike	261.991	-	228.831	175.950

Note: ns=não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Em relação à porcentagem de enraizamento *in vitro*, não houve influência significativa entre os fatores tipo de explante e concentração de AIB (Tab. 2). Verificou-se que a taxa de enraizamento em segmentos nodais (29,66%) foi estatisticamente igual a dos segmentos apicais (24,68%), independente da concentração de AIB utilizada. No entanto, mesmo não tendo diferença estatística para as concentrações de AIB testadas, as maiores médias foram obtidas para explantes em meio suplementado com $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (34,57%), seguida por $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ (28,83%), $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ (27,22%) e controle (18,07%).

Observou-se que a porcentagem de enraizamento foi relativamente baixa para a espécie, isto é, atingiu valores inferiores a 30% tanto para explantes nodais, quanto para os apicais, o que sugere que isso ocorreu em virtude da dificuldade de enraizamento *in vitro* em plantas lenhosas. Segundo Lemos et al. (2006), apesar de os resultados em relação ao número de brotações serem promissores, a capacidade de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* da mangabeira é baixa, provavelmente, devido às variações genóticas da espécie, o que explica a pequena conversão em plantas. Outro fator que pode ter influenciado na rizogênese foi o tempo de exposição ao fitorregulador, tendo em vista que as fases de indução e iniciação, geralmente são dependentes de auxina, mas o alongamento das raízes é inibido pela sua presença (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Neste estudo, a exposição à auxina por um tempo prolongado pode ter apresentado efeito tóxico às brotações de mangabeira.

Os resultados deste trabalho diferem dos encontrados por Soares et al. (2007), que ao testarem

as concentrações de 0 a $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, verificaram enraizamento apenas na concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, com 20% de raízes formadas. Para Silva (2010), os melhores resultados de enraizamento de mangabeira foram obtidos em brotações apicais e laterais, na ausência de AIB e utilizando as concentrações até $2,5 \text{ mg L}^{-1}$. Por outro lado, Reis (2011) utilizando diferentes concentrações de AIB constatou que concentrações acima de $1,86 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB inibiram a rizogênese nas microestacas de mangabeira. De acordo com Fachinello et al. (2005), concentrações altas de auxina exógena provocam efeito estimulador de raízes até um valor máximo, a partir do qual qualquer aumento na sua concentração tem efeito inibitório.

Ainda quanto à rizogênese, o fato de a mangabeira ser responsiva mesmo na ausência de auxina exógena sugere que seus níveis endógenos provenientes de folhas e gemas são suficientes para promover o enraizamento. Porém, neste estudo, as concentrações de AIB ou o tempo de exposição podem não ter promovido o nível adequado de auxinas para induzir o enraizamento adventício.

Em relação ao número médio de raízes adventícias por explante (Fig. 3A), as doses de AIB utilizadas não induziram diferenças significativas para os segmentos apical e nodal. Porém, foi observado que o aumento na concentração de auxina favoreceu o aumento do número de raízes adventícias. Resultados diferentes foram obtidos por Silva (2010), que verificou variação no número de raízes, com a média de 2,5 raízes na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e as demais, 2,0 raízes. Já Reis (2011) verificou que o meio WPM suplementado com concentrações de 0 a 4 mg L^{-1} de AIB não proporcionou diferenças significativas para o número de raízes, sendo 1,4 raízes/explante a maior média obtida.

De acordo com Lemos et al. (2006), o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de grande número de fatores endógenos e exógenos, pois em diferentes condições de cultivo *in vitro* ocorre uma variação nas respostas morfológicas da espécie. Além disso, o padrão de formação de raízes, em algumas espécies, pode estar diretamente relacionado com a presença de calos na base das estacas, pois já houve a desdiferenciação dos tecidos, embora, muitas vezes, as estacas não apresentem raízes (HARTMANN et al., 1997).

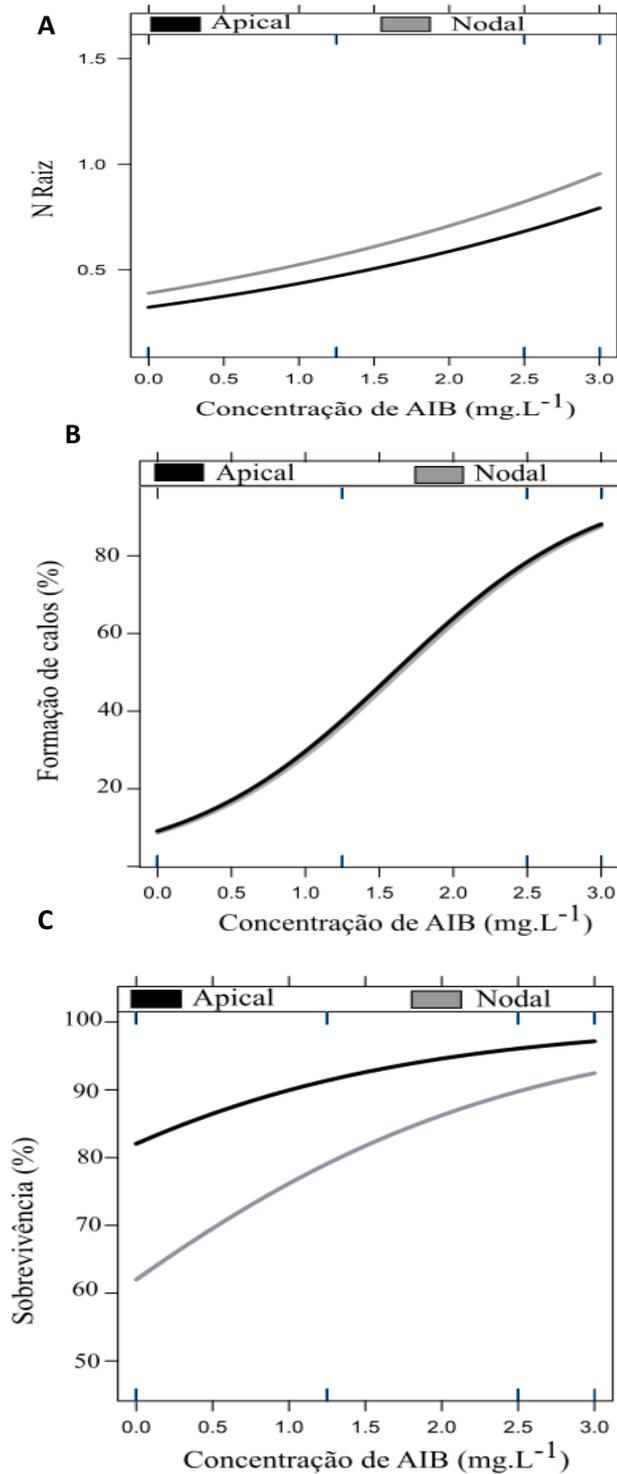
Houve maior porcentagem de formação de calos com o acréscimo nas concentrações de AIB, independente do tipo de explante (Fig. 3B). No tratamento com 3,0 mg L⁻¹ de AIB, a taxa de calogênese foi de 90%, tanto para explantes de ápices caulinares quanto explantes nodais. Isso pode ter sido favorecido pela presença de auxina endógena.

Nesse contexto, a concentração de auxina deve ser a mínima necessária para promover uma iniciação radicular satisfatória, e que possibilite o maior crescimento e desenvolvimento das raízes sem formação de calos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Apesar da calogênese não ser um fator desejável, nem sempre pode ocasionar perdas no desenvolvimento do explante. Porém, se houver crescimento exagerado do tecido caloso pode inibir a formação de raízes, a absorção de nutrientes e água, além de induzir a perdas por morte na etapa de aclimatização (REIS, 2011).

Em relação à taxa de sobrevivência (Figura 3C), verificou-se efeito significativo entre as concentrações de AIB e o tipo de explante. Constatou-se que a adição de AIB ao meio de cultura aumenta significativamente o percentual de sobrevivência tanto para explantes nodais como apicais. No tratamento com 3,0 mg L⁻¹ de AIB, a taxa de sobrevivência para

explante apical (97%) foi estatisticamente superior em relação ao nodal (91%).

Figura 3. Valores médios de número de raízes (A), percentual de formação de calos (B) e sobrevivência (C) em função de diferentes concentrações de AIB e do tipo de explante de *H. speciosa*.



Ainda quanto à sobrevivência, verificou-se que na concentração máxima de AIB, ápices caulinares e segmentos nodais apresentaram altas

Figura 4. Respostas morfogenéticas de explantes nodais e apicais de *H. speciosa* aos diferentes tipos de reguladores de crescimento, em meio de cultura MS. A) e B) Brotações adventícias em segmento nodal; C)

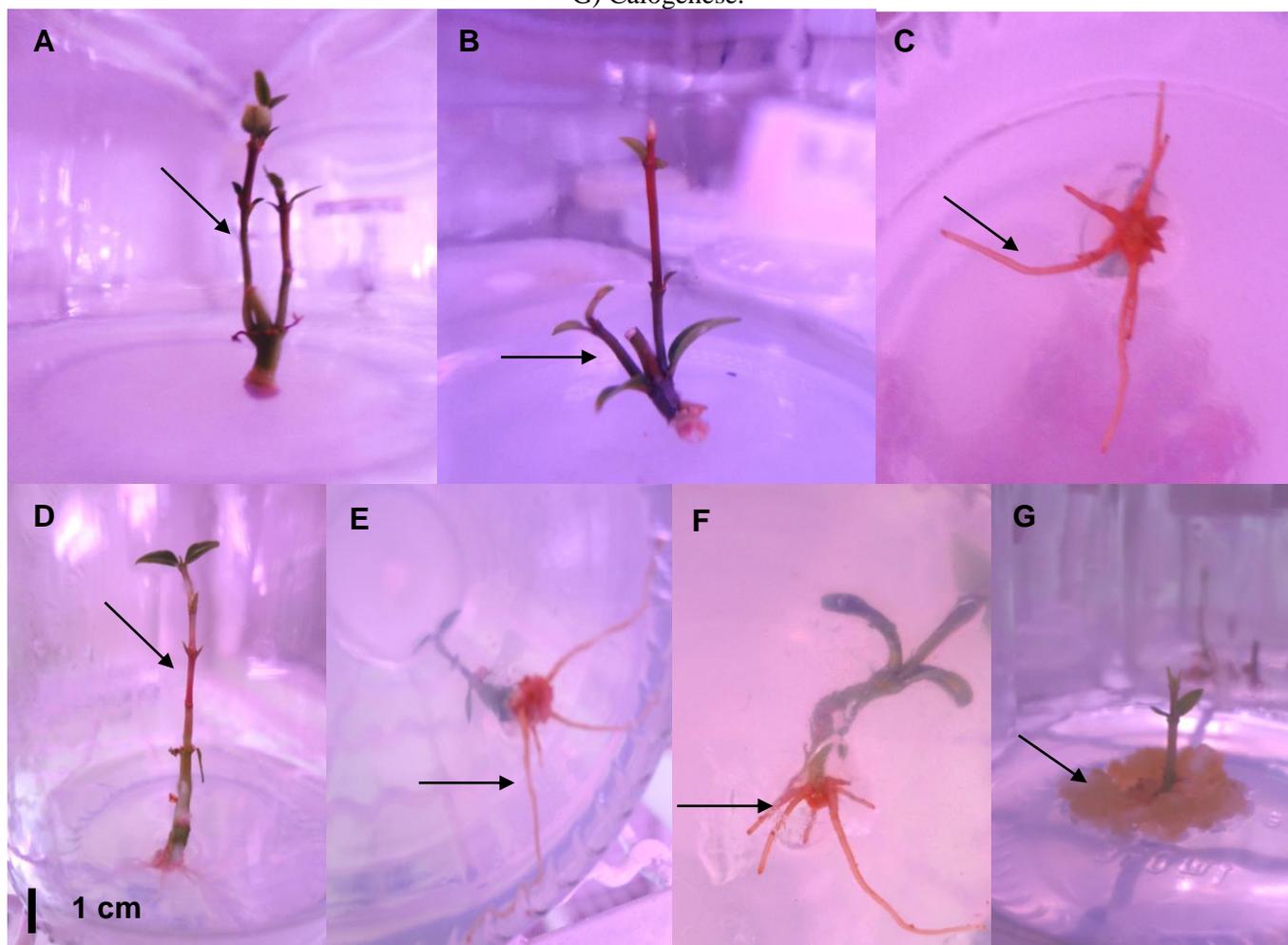
taxas de sobrevivência, com valores acima de 90%. No entanto, ressalta-se que o índice de sobrevivência de estacas de mangabeira não garante que as mesmas estejam em processo de desdiferenciação, ou seja, ocorrendo a rizogênese ou formação de calos.

Assim, a formação de um sistema radicular bem desenvolvido durante a rizogênese é fundamental, pois permite maior chance de sobrevivência das plântulas durante a aclimatização.

De forma geral, é possível observar diferentes aspectos da morfogênese *in vitro* em explantes apicais e nodais de *H. speciosa* (Figura 4).

A partir dos resultados obtidos, compreende-se que a espécie se comporta de maneira semelhante quanto à indução de raízes adventícias *in vitro*, quando submetida à ação de diferentes concentrações de AIB, independente do tipo de explante utilizado. Posteriormente, novos estudos ajustando as concentrações de auxina, em combinação com diferentes tempos de exposição ao fitorregulador, deverão ser conduzidos para promover melhor resposta a rizogênese *in vitro*, de forma a viabilizar a aclimatização das plantas.

Rizogênese adventícia em segmento nodal; D)Gemas adventícias apicais; E e F) Rizogênese em segmento apical; G) Calogênese.



71

CONCLUSÕES

A presença de BAP é dispensável para a indução de brotações em explantes nodais e ápices caulinares de *H. speciosa*. Explantes apicais e de segmentos nodais são responsivos à multiplicação *in vitro*, apesar de a capacidade regenerativa ser superior para os ápices caulinares.

Não houve efeito do AIB para segmentos nodais e ápices caulinares quanto à porcentagem de explantes enraizados. O uso de 3,0 mg L⁻¹ de AIB induz a formação de maior número de raízes, aumenta a calogênese e sobrevivência de segmentos nodais e apicais de *H. speciosa*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de pesquisa a primeira autora.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. M. de; NOGUEIRA, C. A.; BORGES, P. P.; PRADO, A. D. L. do; GONÇALVES, P. J. State of the art of scientific literature on *Hancornia speciosa*: trends and gaps. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 38, n. 4: e-869, 2016.

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. do A. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a

indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, v. 17, p. 339–345, 2011.

BEZERRA, R. M. de F.; ALOUFA, M. A. I.; FREIRE, F. A. de M.; SANTOS, D. D. dos. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 38, n. 5, p. 771-778, 2014.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 1403-1409, 2002.

DIAS, J. M. M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J. L.; LUÍS, A. G. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.275-290, 2001.

FACHINELLO, J. C, HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2005, 221p.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; LEDO, C. A. da S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; CUNHA, M. A. P. da. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.535-543, 2007.

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

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; BELLE, R. A.; CURTI, A. R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 77-82, 2013.

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

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6ª ed. Prentice-Hall: New Jersey, 1997. 770p.

LE MOS, E. E. P. de; COSTA, M. A. P. de CARVALHO; ALOUFA, M. A. I.; LÉDO, A. da S.; ALMEIDA, W. A. B. de; DANTAS, A. C. V. L.; SILVA, S. A.; SOUZA, F. V. D. Micropropagação. In: SILVA JUNIOR, J. F. da; LÉDO, A. S. (Ed.). **A cultura da mangaba**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p. 125-133.

MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.350-355, 2014.

MORGANTE, C. V.; LOMBARDI, S. P. **Hormônios Vegetais e Biotecnologia**. Piracicaba: Esalq, 2004. 13p.

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

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OLIVEIRA, K. S. de; OLIVEIRA, M. da S.; PEREIRA, E. C.; LIMA, S. C. de; ALOUFA, M. A. I. Efeito de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 38, n. 4, p. 601-607, 2014.

OLIVEIRA, K. S. de; FREIRE, F. A. de M.; ALOUFA, M. A. I. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Floresta**, v. 46, n. 3, p. 335 - 342, 2016.

PAREDES, K.; DELAVEAU, C.; CARRASCO, P.; BAEZA, C.; MORA, F.; URIBE, M. E. *In vitro* bulbing for the propagation of *Traubia modesta*

(Amaryllidaceae), a threatened plant endemic to Chile. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 41, n. 2, p. 207-214, 2014.

PIOTTO, K. D. B. **Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 2013. 157 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 07 de mar de 2017.

REIS, C. V. dos; SOUSA, C. M.; CARVALHO, A. C. P. P. de; MIRANDA, R. M. Efeitos do tipo de explante e diferentes balanços de auxina e citocinina na regeneração *in vitro* de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON. **Agronomia**, v. 38, n.1, p. 93-97, 2004.

REIS, L. L. dos. **Propagação de *Hancornia speciosa* Gomes – apocynaceae, por alporquia e micropropagação**. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2011.

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

SILVA, E. de O. **Propagação e armazenamento de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2010.105 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

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

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. R. G.

Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, 2011.

SOARES, A. N. R. et al. Physiological quality of mangaba seeds submitted to drying. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, KEN, v.10, n. 52, p. 4806-4813, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Trad. de E. R. Santarém. Porto Alegre: Artmed, 2009. 720 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: SPI, 1998, p.11-19.

VIEIRA, M. C.; E. SOUZA, R. B.; PAULA, M. S. P.; NAVES, R. V.; SILVA, G. D. Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes): uma frutífera promissora do Brasil. **Scientific Electronic Archives**, Mato Grosso, v. 10, n. 2, 2017.