

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
BIOTECNOLOGIA

LUIZ GUILHERME VIEIRA DE CARVALHO

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* GOMES)

IN VITRO ESTABLISHMENT OF 'MANGABEIRA' (*Hancornia speciosa* GOMES)

DOURADOS-MS

2018

LUIZ GUILHERME VIEIRA DE CARVALHO

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* GOMES)

IN VITRO ESTABLISHMENT OF 'MANGABEIRA' (*Hancornia speciosa* GOMES)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Roberta Damiani

DOURADOS-MS

2018

LUIZ GUILHERME VIEIRA DE CARVALHO

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* GOMES)

IN VITRO ESTABLISHMENT OF 'MANGABEIRA' (*Hancornia speciosa* GOMES)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, sob a orientação da professora Dra. Cláudia Roberta Damiani.

Prof^a. Dr^a. Cláudia Roberta Damiani (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Lorena Pastorini Donini

M^a. Daniella Arai Zanetta Bassan

Dourados-MS, Dezembro de 2018.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C331e Carvalho, Luiz Guilherme Vieira De
Estabelecimento in vitro de mangabeira do cerrado (*Hancornia speciosa*
Gomes) / Luiz Guilherme Vieira De Carvalho -- Dourados: UFGD, 2018.
29f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Cláudia Roberta Damiani

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande
Dourados
Inclui bibliografia

1. sementes. 2. germinação. 3. contaminação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças e perseverança para não desanimar e desistir durante esses quatro anos de graduação.

Aos meus queridos pais Luzinete e Nivalcir, que me proporcionaram condições para que hoje estivesse aqui, além de muito amor e carinho. A meu irmão Lucas Gabriel e todos os meus familiares pelo apoio e carinho.

A todos os meus amigos que estiveram comigo durante minha graduação, em especial, Evelyn, Geisianny, João, Karine, Karla, Natã, Markus e Rafaela, que mesmo nos momentos de dificuldade e desânimo não mediram esforços para me ajudar com seu companheirismo, ajudando-me com seus conselhos, experiências e críticas construtivas.

Aos meus colegas de laboratório, que sempre estiveram à disposição para me ajudar na elaboração dos experimentos deste trabalho, em especial, Alex, Aline, Henrique e Thalles.

Ao pessoal do assentamento Lagoa Grande, Sr. Adonias, Sr. Jair e dona Luciana, que me cederam o local para coletar o material em estudo, contribuindo para a realização do meu trabalho.

A minha querida orientadora Prof^a Dr^a Cláudia Roberta Damiani, que me acolheu em seu laboratório de pesquisa, sempre me dando muito amor carinho e atenção, me orientando não apenas na minha formação acadêmica, mas também em minha formação pessoal, sendo hoje pra mim muito mais que uma orientadora, sendo uma segunda mãe.

A minha querida amiga Prof^a Dr^a Lorena Pastorini Donini, pela disponibilidade em ajudar com minhas dúvidas.

A todos os professores dessa instituição que contribuíram para minha formação, e a todos que de alguma forma acabaram contribuindo para a realização desse trabalho.

Muito obrigado a todos!

Dedico esse trabalho a minha querida mãe, Luzinete Vieira do Nascimento, por sempre estar ao meu lado, sendo meu alicerce em todos os momentos de minha vida.

RESUMO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), pertencente à família Apocynaceae é uma árvore frutífera encontrada em diversas regiões do Brasil. Seus frutos apresentam um alto valor nutritivo e são muito utilizados como matéria prima para fabricação de doces, sorvetes, sucos e licores. Sua produção, no entanto, é quase que totalmente extrativista, havendo pouquíssimos métodos de plantio comercial, devido à dificuldade de sua propagação natural. A dificuldade da propagação sexuada da mangabeira se dá principalmente pela recalcitrância de suas sementes, ou seja, não suportam armazenamento a baixas temperaturas e dessecação, além disso, a polpa dos frutos da mangabeira apresenta inibidores de germinação, o que dificulta sua propagação sexuada. Uma alternativa para contornar esse problema de propagação, está no cultivo *in vitro* através da micropropagação. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de germinação *in vitro* de sementes e estabelecimento *in vitro* de explantes de mangabeira, visando à obtenção de mudas micropropagadas. Desse modo, foram realizados três experimentos. Experimento 1: Efeito do GA₃ em diferentes concentrações (0; 2,5; 5,0 e 10 mg L⁻¹) na germinação *in vitro*. Experimento 2: Efeito do hipoclorito de sódio em diferentes tempos (5, 10 e 15 minutos) de imersão e em diferentes concentrações (1,25 e 2,5%) no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais. Experimento 3: Efeito do hipoclorito de sódio (2,5%), PPM® (5%) e associação dos dois no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais. Não foi observado explantes estabelecidos, sendo o principal entrave a dessecação das sementes e a contaminação fúngica que foi de 100%. No estabelecimento utilizando segmentos nodais, não foram observados explantes estabelecidos em nenhum dos experimentos, sendo que a contaminação fúngica a oxidação dos explantes foram a principal causa da ineficiência do estabelecimento, sendo a contaminação bacteriana extremamente baixa em todos os tratamentos.

Palavras chave: sementes, germinação, contaminação.

ABSTRACT

The mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), belongs to the Apocynaceae Family being a fruitful tree found in several regions of Brazil. Its fruits present high nutritional value and are often used as raw material for the production of sweets, ice creams, juices and liqueurs, Its production, however, is almost entirely extractive, having few methods of commercial plantation, due to the difficulty of its natural propagation. The difficulty of mangabeira's sexual propagation is mainly because of its seed's recalcitrance, which means they don't support storage in low temperatures and desiccation, and furthermore, the pulp of mangabeira's fruits present germination inhibitors, that difficult its sexual propagation. An alternative to conter this propagation problem in the *in vitro* cultivation through micropropagation. This work had as its goal to review the capacity of *in vitro* establishment and germination of mangabeira explants, aiming the achievement of micropropagated seedlings. Therefore, three experiments were realized. Experiment 1: GA₃'s effect on different concentrations (0; 2.5; 5.0 and 10 mg L⁻¹) on the *in vitro* germination. Experiment 2: Sodium hypochlorite's effect on different immersion periods (5, 10 and 15 minutes) and on different concentrations (1.25 and 2.5%) on the *in vitro* establishment of nodal segments. Experiment 3: Effect of sodium hypochlorite (2.5%), PPM® (5%) and their association on the *in vitro* establishment of nodal segments. The explants' germination was not observed, the main hindrance being the desiccation of the seeds and the fungal contamination that was of 100%. In the establishment using nodal segments, no established explants on any of the experiments were observed, being that the fungal contamination and the oxidation of the explants were the main cause of the establishment's inefficiency, being the bacterial contamination extremely low on all treatments

Keywords: seeds, germination, contamination.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (0; 2,5; 5,0 e 10 mg L ⁻¹) na germinação <i>in vitro</i> de mangabeira.....	12
2.2 Efeito do hipoclorito de sódio (1,25 e 2,5% de cloro ativo) e tempo de desinfestação (5; 10 e 15 minutos) no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes nodais caulinares de mangabeira.....	13
2.3 Efeito dos agentes desinfetantes PPM® (5%), hipoclorito de sódio (2,5%) e a associação de ambos no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes nodais caulinares de mangabeira	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1 Efeito de diferentes concentrações (0; 2,5; 5,0 e 10 mg L ⁻¹) de ácido giberélico na germinação <i>in vitro</i> de mangabeira.....	15
3.2 Efeito do hipoclorito de sódio (1,25 e 2,5% de cloro ativo) e tempo de desinfestação (5; 10 e 15 minutos) no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes nodais caulinares de mangabeira.....	18
3.3 Efeito dos agentes desinfetantes PPM® (5%), hipoclorito de sódio (2,5%) e a associação de ambos no estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes nodais caulinares de mangabeira	21
4 CONCLUSÃO	23
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1 INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie frutífera tropical de ocorrência natural no Brasil, pertencente à família Apocynaceae (SOARES et al., 2014). É encontrada em várias regiões do país, principalmente na região nordeste e em áreas de Cerrado. Essa frutífera de porte médio se encontra em fase de domesticação, apresentando grande importância econômica (VIEIRA NETO et al., 2009; PINTO et al., 2014).

Quanto ao uso e formas de exploração da espécie, podemos destacar o uso alimentar, medicinal e laticífero (VIEIRA et al., 2010). Os frutos da mangabeira são muito apreciados devido a seu aroma agradável, sabor característico, elevado valor nutricional e boa digestibilidade (SOARES et al., 2011). Dentre as propriedades nutritivas encontram-se altos teores de vitaminas A, B1, B2 e C, proteínas, cálcio e fósforo (BARROS, 2006), sendo estes valores superiores aos encontrados na maioria das espécies frutíferas (FERREIRA et al., 2018). Os frutos podem ser consumidos *in natura* e também utilizados como matéria prima na indústria de sucos, doces, geléias, sorvetes, licores, vinhos, coquetéis e xaropes.

Devido à presença nos frutos de altos teores de vitamina C, compostos fenólicos e ácido clorogênico, além do elevado valor nutricional, possuem ação bioativa apresentando alta capacidade antioxidante (GONÇALVES, 2017). Estudos conduzidos por Pereira et al. (2015) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de mangabeira possuem um potencial efeito antidiabético, sendo verificado pelos autores que seu mecanismo de ação ocorre através da inibição da α -glicosidase, aumentando a captação de glicose. Além do extrato foliar, estudos conduzidos por Marinho et al. (2011) demonstraram que o látex produzido pela espécie, demonstra atividade anti-inflamatória através da inibição da produção de óxido nítrico, prostaglandina sintase e citocinas.

O látex obtido da mangabeira também pode ser aproveitado para a produção de borracha. De acordo com Gomes (2013), embora algumas das propriedades da borracha obtida de mangabeira seja inferior ao da seringueira, a mistura de até 20% em massa do látex da mangabeira no látex da seringueira, produz uma borracha com propriedades muito semelhantes à seringueira. De acordo com o autor, esta mistura poderá ser utilizada para produção de utensílios a base de borracha natural, sem a perda da qualidade do produto. Embora apresente um grande potencial de aproveitamento, as populações de mangabeira têm sido reduzidas devido sua exploração insustentável e ao desmatamento nas regiões onde se encontram (BARROS et al., 2006). Associado a isso, as sementes de mangabeira são

recalcitrantes, ou seja, para a obtenção de mudas via sexuada, a semeadura deve ser realizada imediatamente após o despulpamento dos frutos (VIEIRA et al., 2010). De acordo com os últimos autores, caso a semeadura não seja imediata, as sementes podem ser conservadas por um período de um mês à 10°C. Estudos conduzidos por Barros et al. (2010) demonstraram que as sementes de mangabeira podem ser secadas por até 36 horas em ambiente laboratorial, com temperatura de 27 °C e umidade relativa do ar de 45 %, ou, em dessecador por 48 horas, sem alteração da qualidade fisiológica. Nestas condições de secagem, ambiente e dessecador, os autores observaram percentuais de germinação em torno de 75,0 a 72,3 % e 70 a 67 %, respectivamente.

Outra forma de cultivo da mangabeira pode ser obtida por meio de enxertia, no entanto requer à obtenção de porta-enxertos, os quais, neste caso, são obtidos de pés-francos (plantas obtidas de sementes) (PEREIRA et al., 2002). Desse modo, o desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa da espécie são importantes e necessárias, visto que existem poucas informações sobre a sua diversidade e estratégias de propagação (SILVA et al., 2011).

A micropropagação *in vitro* se mostra uma técnica viável para a propagação de mudas de mangabeira, uma vez que permite a diminuição da coleta extrativista, minimizando a erosão genética e possibilitando a produção em larga escala de matéria prima de qualidade (GONÇALVES et al., 2018). É uma técnica eficiente na propagação de espécies com baixa taxa germinativa, como é o caso da mangabeira, por maximizar a taxa de germinação, possibilitando a produção de mudas uniformes e com boa qualidade fitossanitária (STEIN et al., 2007).

Trabalho recente no sentido de estabelecer a mangabeira *in vitro* foram conduzidos por Santos et al. (2017). Os autores avaliaram a germinação *in vitro* de sementes dessecadas naturalmente por 24, 48, 96 e 192 horas após o despulpamento dos frutos e a adição de diferentes concentrações de sacarose, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹ no meio de cultura e concluíram que a secagem natural de sementes de mangabeira pode ser realizada até 106 horas após a sua extração dos frutos, mantendo um teor de umidade de 36,8 % sem prejudicar a taxa de germinação *in vitro*. No entanto, os autores verificaram que o aumento da sacarose a 60 g L⁻¹ reduz o percentual de germinação.

Considerando a importância da mangabeira como espécie nativa frutífera do Cerrado, sua dificuldade de propagação por métodos tradicionais e a carência de estudos sobre a propagação da espécie e seleção de genótipos superiores, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de germinação e estabelecimento *in vitro*, visando à propagação *in vitro* de mangabeira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos que compõem este trabalho foram realizados no laboratório de Biotecnologia Vegetal, do bloco multidisciplinar da Faculdade de Ciências Biológicas e ambientais (FCBA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados-MS, no período de setembro de 2017 a junho de 2018.

O material vegetal utilizado foram ramos vegetativos de *Hancornia speciosa* Gomes, coletados de plantas encontradas no assentamento rural Lagoa Grande, no ponto de coordenadas geográficas 21°59'43" S e 55°19'387" W, na região da Grande Dourados – MS, enquanto que as sementes foram obtidas da cidade de Montes Claros do Estado de Minas Gerais, no ponto de coordenadas geográficas 16° 44' 13" S e 43° 51' 53" W. As sementes foram compradas *online*, transportadas e entregue pela Empresa Brasileira de Correios.

2.1 Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (0; 2,5; 5,0 e 10 mg L⁻¹) na germinação *in vitro* de mangabeira

Neste experimento, foram testadas diferentes concentrações de ácido giberélico - GA₃ (0; 2,5; 5,0 e 10 mg L⁻¹) na germinação *in vitro* de sementes de mangabeira. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 4 repetições e cada repetição constituída por 10 sub-repetições, totalizando 40 tubos de ensaio por tratamento com uma semente cada.

O procedimento de assepsia e inoculação foi realizado em cabine de fluxo laminar. As sementes foram desinfestadas inicialmente em álcool etílico (70%) durante 1 minuto, e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio (NaClO), com 2,5 % de princípio ativo, durante 10 minutos em agitação constante. Para cada 1000 mL de solução de NaClO foi adicionado 1,0 mL de Tween 80. Após a esterilização superficial, as sementes foram lavadas em água estéril por três vezes para a retirada dos resíduos. Para a germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM (Wood Plant Medium, LLOYD & MCCOWN, 1980), acrescido de GA₃ conforme tratamento, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5.8 antes da adição do ágar. O meio de cultura, antes da inoculação das sementes foi esterilizado em autoclave a 120°C ± 1 e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos de ensaio contendo as sementes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C e submetidos a um período

de escuro de sete dias, sendo após este período, mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Aos 30 dias após a inoculação avaliou-se, a porcentagem de contaminação fúngica, bacteriana e a porcentagem de germinação.

Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$ e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999).

2.2 Efeito do hipoclorito de sódio (1,25 e 2,5% de cloro ativo) e tempo de desinfestação (5; 10 e 15 minutos) no estabelecimento *in vitro* de explantes nodais caulinares de mangabeira

Neste experimento foram testados diferentes tempos de desinfestação com diferentes concentrações de cloro ativo no estabelecimento *in vitro* de ramos vegetativos da mangabeira. Os tratamentos realizados consistiram de duas concentrações de hipoclorito de sódio (1,25% e 2,5% de cloro ativo) e três tempos de imersão (5, 10 e 15 minutos), sendo obtido um esquema fatorial 2×3 , totalizando 6 tratamentos. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 4 repetições e cada repetição constituída por 10 sub-repetições, totalizando 40 tubos de ensaio por tratamento com um explante cada. Os explantes utilizados foram nós caulinares com duas gemas laterais.

O procedimento de assepsia e inoculação foi realizado em cabine de fluxo laminar. Os ramos vegetativos foram inicialmente desinfestados em álcool etílico (70%) durante 1 minuto seguido da esterilização superficial em solução de hipoclorito de sódio (conforme tratamento) em agitação constante. Para cada 1000 mL de solução foi adicionado 1,0 mL de Tween 80, em seguida os ramos foram lavados em água estéril por três vezes para a retirada dos resíduos. Após a realização do procedimento de assepsia, os ramos foram segmentados e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM (Wood Plant médium, LLOYD & MCCOWN, 1980), acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 6 g L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5.8 antes da adição do ágar. O meio de cultura antes da inoculação dos explantes foi esterilizado em autoclave à $120^\circ\text{C} \pm 1$ e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ onde foram submetidos a um período de escuro de sete dias, sendo após este período, mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 30 dias após a inoculação. Sendo as variáveis analisadas: percentual de contaminação fúngica e bacteriana, percentual de oxidação dos explantes e percentual de explantes estabelecidos *in vitro*, sendo considerados estabelecidos os explantes que emitiram brotações. Os explantes considerados totalmente oxidados e/ou contaminados foram descartados.

Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$ e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999).

2.3 Efeito dos agentes desinfetantes PPM® (5%), hipoclorito de sódio (2,5%) e a associação de ambos no estabelecimento *in vitro* de explantes nodais caulinares de mangabeira

Neste experimento foram testados os efeitos dos agentes desinfetantes PPM® (Plant Preservative Mixture), hipoclorito de sódio (NaClO) e a associação de ambos na esterilização superficial dos ramos vegetativos, para o estabelecimento *in vitro* de mangabeira. Os tratamentos realizados foram: PPM® (5%), hipoclorito de sódio (2,5%) e associação de ambos, com tempo de imersão de 20 minutos para todos os tratamentos. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, sendo 3 tratamentos compostos por 4 repetições e cada repetição constituída por 10 sub-repetições, totalizando 40 tubos de ensaio por tratamento com um explante cada. Os explantes utilizados foram nós caulinares com duas gemas laterais.

O procedimento de assepsia e inoculação foi realizado em cabine de fluxo laminar. Os ramos vegetativos foram inicialmente desinfestados em álcool etílico (70%) durante 1 minuto, seguido da esterilização superficial nos respectivos tratamentos em agitação constante. Para cada 1000 mL de solução foi adicionado 1,0 mL de Tween 80, em seguida os ramos foram lavados em água estéril por três vezes para a retirada dos resíduos. Após a realização do procedimento de assepsia, os ramos foram segmentados e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM (Wood Plant médium, LLOYD & MCCOWN, 1980), acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 6 g L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5.8 antes da adição do ágar. O meio de cultura antes da inoculação dos explantes foi esterilizado em autoclave à $120^\circ\text{C} \pm 1$ e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ onde foram submetidos a um período de

escuro de sete dias, sendo após este período, mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 30 dias após a inoculação. Sendo as variáveis analisadas: percentual de contaminação fúngica e bacteriana, percentual de oxidação dos explantes e percentual de explantes estabelecidos *in vitro*, sendo considerados estabelecidos, os explantes que emitiram brotações. Os explantes considerados totalmente oxidados e/ou contaminados foram descartados.

Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$ e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de diferentes concentrações (0; 2,5; 5,0 e 10 mg L^{-1}) de ácido giberélico na germinação *in vitro* de mangabeira

Em todos os tratamentos testados as sementes apresentaram elevado índice de contaminação fúngica e ao final de 30 dias não foi observada germinação em nenhum dos tratamentos, não havendo assim diferença estatística entre as médias dos tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de contaminação fúngica e germinação de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes, em função de diferentes concentrações de ácido giberélico, aos 30 dias.

GA ₃ (mg L^{-1})	Contaminação fúngica (%)	Germinação (%)
0	100 A*	0 A
2,5	100 A	0 A
5,0	100 A	0 A
10	100 A	0 A

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. GA₃- ácido giberélico.

A ausência de germinação pode ser atribuída a dois fatores, à infecção fúngica das sementes e/ou a dessecação do embrião. Sendo que no primeiro caso, a presença de micro-organismos pode levar ao consumo das reservas da semente e inviabilizar o desenvolvimento do embrião. E no segundo caso, pelo fato das sementes de mangabeira apresentarem recalitrância, conforme relatado por Pinheiro et al. (2001), ou seja, não tolerarem a dessecação imposta pelo ambiente, após a retirada das mesmas, da polpa dos frutos. Associado a isso, as sementes utilizadas neste experimento foram obtidas de outro Estado, neste caso do Estado de Minas Gerais podendo ser o modo de armazenamento das sementes, acondicionamento e transporte um dos fatores que comprometeu a viabilidade de germinação das sementes utilizadas.

De acordo com Corder e Borges Junior (1999), existem vários fatores que podem afetar o vigor germinativo das sementes, entre eles a dormência das sementes e a presença de micro-organismos, sendo os fungos e as bactérias os principais agentes infectantes, que além de afetar a germinação, podem levar a formação de plântulas anormais ou até a sua morte. Ainda segundo os autores, a presença de patógenos nas sementes utilizadas em ensaios de laboratórios podem fornecer explantes contaminados quando utilizados na micropropagação.

Couto et al. (2004) observaram em seu estudo com mogno (*Swietenia macrophylla* King) que as sementes contaminadas com fungos e bactérias não foram capazes de germinar. Assim como os resultados obtidos por Corder e Borger Junior (1999), que verificaram que a presença de fungos e bactérias nas sementes de *Acacia mearsii* foi o principal fator para a ausência de germinação. Estes resultados corroboram com os observados neste trabalho, onde a germinação foi inibida por completo devido a contaminação com fungos, mesmo após ser utilizado o procedimento de assepsia das sementes recomendado por Agrios (1997).

Outro fator que justifica a ausência de germinação da mangabeira é a recalitrância de suas sementes. Roberts (1973) classifica as sementes em duas categorias, ortodoxas e recalitrantes, sendo as recalitrantes, sementes sensíveis à dessecação, as quais não sobrevivem com baixos níveis de umidade, impedindo assim seu armazenamento por longos períodos. A mangabeira como a grande maioria das espécies vegetativas do Cerrado possui sementes recalitrantes, o que segundo Lorenzi (1992) dificulta a germinação da espécie associado ao fato da polpa da mangabeira também possuir inibidores de germinação. Quando as sementes apresentam na sua estrutura, inibidores de germinação, como exemplo o ácido abscísico, ou até mesmo quando a germinação é irregular, uma forma de auxiliar no processo germinativo é a aplicação de giberelinas. Neste experimento, a adição do regulador de crescimento, ácido giberélico, não exerceu nenhum efeito sobre a germinação (Tabela 1).

Embora, segundo Melo et al. (1979), o tratamento de sementes com giberelinas e citocininas deveria auxiliar na germinação *in vitro* das sementes, a ausência de germinação neste experimento deve-se provavelmente a morte do embrião por dessecação, uma vez que as sementes haviam sido retiradas dos frutos a muito tempo e provavelmente não foram bem aclimatadas e transportadas. O armazenamento de sementes recalcitrantes por longos períodos e a má aclimação das mesmas podem levar a morte do embrião, devido aos baixos níveis de umidade, impossibilitando sua germinação. Pammenter e Berjak (1999) relatam que a perda de água durante o processo de secagem de sementes recalcitrantes, causam alterações metabólicas, resultando assim na morte das sementes. Em seus estudos Santos et al. (2010) avaliaram a conservação de sementes de mangabeira em relação ao tempo de estocagem e observaram que a secagem natural das sementes prejudica a eficiência de sua germinação.

Os trabalhos encontrados na literatura, de sucesso na germinação *in vitro* de mangabeira, utilizam sementes recém-retiradas dos frutos maduros as quais são inoculadas imediatamente em meio de cultura, evitando assim a dessecação das mesmas. De acordo com a literatura, as sementes de mangabeira devem ser postas para germinar imediatamente ou no máximo em até 48h, depois da retirada dos frutos, sendo que após este período seu poder germinativo é reduzido inviabilizando sua germinação (ESPINDOLA et al., 1993; VIEIRA et al. 2010; BARROS et al., 2010). Trabalho conduzido por Soares et al. (2009) avaliou a germinação *in vitro* de sementes de mangabeira logo após o despulpamento dos frutos, em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose, concentração de ácido giberélico e de três níveis de pH e obtiveram percentagens de germinação superiores a 90% em quase todos os tratamentos avaliados.

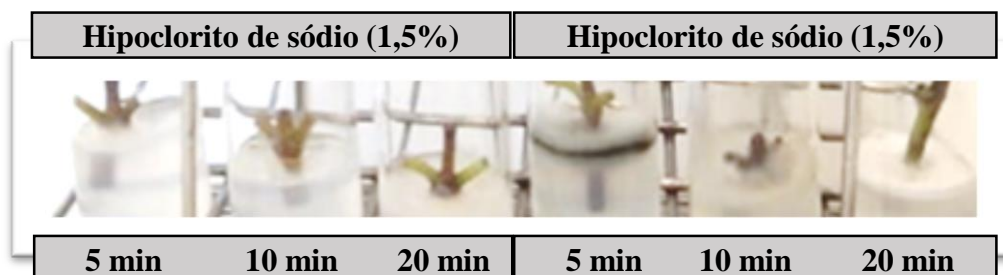
Em seus estudos de germinação *in vitro* de mangabeira, Oliveira et al. (2014) utilizaram sementes provindas de frutos adquiridos de feiras populares em Natal-RN, as quais tiveram seus tegumentos extraídos, para avaliar o efeito de diferentes meios de cultura na germinação. Os autores avaliaram meios alternativos ao meio de cultura solidificado com ágar sendo estudados suportes como a vermiculita e areia e verificaram 90% de germinação em meio contendo vermiculita, areia barrada e água. Pinheiro et al. (2001), na tentativa de maximizar a porcentagem de germinação *in vitro* de mangabeira testaram a influência da sacarose, do ácido giberélico e de diferentes meios de cultura, utilizando sementes, com e sem tegumento, provindas de plantas-matriz vigorosas que foram pré-selecionadas e verificaram maiores taxas de germinação em sementes sem tegumento e inoculadas em meio MS líquido suplementadas com 0,1 mg L⁻¹ de ácido giberélico.

3.2 Efeito do hipoclorito de sódio (1,25 e 2,5% de cloro ativo) e tempo de desinfestação (5; 10 e 15 minutos) no estabelecimento *in vitro* de explantes nodais caulinares de mangabeira

Os dados obtidos para as variáveis, contaminação fúngica, bacteriana e sobrevivência não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (Tabela 2). Sendo que para todos os tratamentos testados a contaminação bacteriana foi inferior a 10%. Observou-se também que o aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio na esterilização superficial promoveu maiores taxas de oxidação dos explantes.

Embora a contaminação bacteriana tenha sido mínima, o que inviabilizou o estabelecimento dos explantes de mangabeira foi o alto índice de contaminação fúngica. Aos sete dias, o percentual de sobrevivência dos explantes foi inferior a 10% e ao final de 30 dias devido à contaminação fúngica e oxidação dos explantes não foi possível obter nenhum explante estabelecido, como se pode observar na Figura 1.

Figura 1. Aspecto visual dos explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), tratados com hipoclorito de sódio em diferentes tempos de imersão, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados/MS, 2018.



Uma provável causa para ineficiência no combate de contaminação fúngica pode estar relacionado com o fato de o material vegetal utilizado ser oriundo de plantas adultas mantidas em campo, as quais não receberam nenhum tratamento fitossanitário. As espécies lenhosas, como é o caso da mangabeira, tem dificuldades para serem estabelecidas *in vitro*, principalmente se o material utilizado for proveniente de plantas já adultas, já que podem apresentar infestações por micro-organismos endógenos ou exógenos (COUTO et al., 2004). Esses micro-organismos contaminantes competem com os explantes pela fonte de nutriente presente no meio de cultura e liberam metabolitos tóxicos no meio, o que pode levar a morte da plântula (PEREIRA et al., 2011).

Tabela 2. Porcentagem de contaminação fúngica; contaminação bacteriana e oxidação, em função de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão na esterilização superficial de explantes nodais caulinares de *Hancornia speciosa* Gomes, aos 30 dias de cultivo.

	Contaminação fúngica (%)			Contaminação bacteriana (%)			Oxidação (%)			Sobrevivência (%)		
	NaClO (%)			NaClO (%)			NaClO (%)			NaClO (%)		
Tempo de desinfestação (min)	1,5	2,5	MG	1,5	2,5	MG	1,5	2,5	MG	1,5	2,5	MG
5	90 aA*	85 aA	87,5 _a	7,5 aA	5 aA	6,3 _a	52,5aA	27,5bB	40 _b	5 aA	10 aA	7,5 _a
10	87,5aA	92,5 aA	90 _a	7,5 aA	0 aA	3,8 _a	50 aA	30 bB	40 _b	5 aA	7,5aA	6,3 _a
15	97,5aA	95 aA	96,3 _a	5 aA	0 aA	2,5 _a	70 aA	57,5aA	63,8 _a	0 aA	5 aA	2,5 _b
MG	91,7 <u>A</u>	90,8 <u>A</u>		6,7 <u>A</u>	1,7 <u>B</u>		57,5 <u>A</u>	38,3 <u>B</u>		3,3 <u>A</u>	7,5 <u>A</u>	

*Médias seguidas por letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. HS – Hipoclorito de Sódio; MG – Média Geral

De acordo com Sato et al. (2001) quando o material vegetal é provindo de campo o mesmo pode trazer consigo elevadas concentrações de micro-organismo, sendo necessária a utilização de tratamentos desinfetantes mais criteriosos, uma vez que esses materiais apresentam maiores níveis de contaminação (SOUZA e JUNGHANS, 2006). No entanto, mesmo com a realização da desinfestação dos explantes, micro-organismos endógenos permanecem no material vegetal (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; CERQUEIRA et al., 2014), podendo se multiplicar e competirem pelos nutrientes do meio de cultura com a planta ou podendo se manter latentes.

A utilização de agentes germicidas é de extrema importância para no estabelecimento *in vitro*, uma vez que promovem a redução de contaminantes dos explantes (CHAVES et al., 2005). No entanto, é necessário se atentar a concentrações dos desinfetantes utilizados, assim como a combinação de seus princípios ativos e o tempo de exposição deles ao material vegetal (MONTARROYOS, 2000), uma vez que expostas a elevadas concentrações ou durante longos períodos podem provocar efeitos não desejados, como a oxidação do material vegetal.

Além da contaminação por micro-organismos, outro fator que pode dificultar o estabelecimento *in vitro* é a oxidação fenólica, que ocorre pelo fato de algumas enzimas oxidarem os fenóis formando quinonas que são responsáveis pela coloração amarronzada dos explantes, o que pode ocasionar a inibição do crescimento e a morte dos explantes dependendo da espécie (MONACO et al., 1977; BASSAN et al., 2006). Teixeira (2001) ressalva que o uso de explantes jovens (mais herbáceos) oxidam menos que explantes mais velhos (mais lenhosos). Neves (2017) em seu trabalho de estabelecimento de bambu observou a oxidação dos explantes devido ao uso de hipoclorito de sódio 1% durante apenas dois minutos, onde os mesmos não emitiram brotações inviabilizando o sucesso de estabelecimento. O uso de hipoclorito de sódio nesse trabalho se mostrou prejudicial ao tecido vegetal e não apresentou eficiência no controle da contaminação por micro-organismos, indicando que devem ser realizados outros estudos sobre o melhor método de assepsia para a *Hancornia speciosa*.

3.3 Efeito dos agentes desinfetantes PPM® (5%), hipoclorito de sódio (2,5%) e a associação de ambos no estabelecimento *in vitro* de explantes nodais caulinares de mangabeira

De acordo com os dados obtidos nesse experimento, pode-se observar que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para as variáveis avaliadas (Tabela 3). Todavia, não foi observado casos de contaminação bacteriana em nenhum dos tratamentos testados, mas foram observados percentuais elevados de contaminação fúngica e oxidação, os quais comprometeram o estabelecimento *in vitro*, pois levaram os explantes à morte. Na figura 2 é possível observar o aspecto dos explantes, após os 15 dias de estabelecimento.

Tabela 3. Porcentagem de contaminação fúngica; contaminação bacteriana e oxidação, em função de diferentes agentes desinfetantes na esterilização superficial de explantes nodais caulinares de *Hancornia speciosa* Gomes, aos 30 dias de cultivo.

Tratamentos	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)	Oxidação (%)
PPM	100 A*	0 A	96 A
HS	100 A	0 A	95 A
PPM + HS	100 A	0 A	87 A

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro. PPM - Plant Preservative Mixture; HS – Hipoclorito de sódio.

Segundo Erig et al. (2005), a eficiência da desinfestação *in vitro* depende diretamente das condições fitossanitárias da planta matriz. Todavia, em campo é muito difícil manter as condições fitossanitárias desejáveis das plantas matriz. Grattapaglia e Machado (1998) recomendam tratamentos desinfetantes mais criteriosos para materiais provindos do campo, devido os explantes apresentarem maiores níveis de contaminação, sendo recomendado aumentar a concentração e o tempo de exposição dos agentes desinfetantes, em relação de explantes provindos de ambientes onde houve controle fitossanitário. Contudo, essa exposição pode levar ao aumento da taxa de oxidação dos explantes.

A utilização de hipoclorito de sódio a 2,5% não se mostrou eficaz no combate de contaminação fúngica, o que pode ser explicado devido à concentração de hipoclorito de sódio a 2,5% sendo necessária a utilização de concentrações mais elevadas, conforme observado por Picolotto et al. (2007) durante o estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira, onde

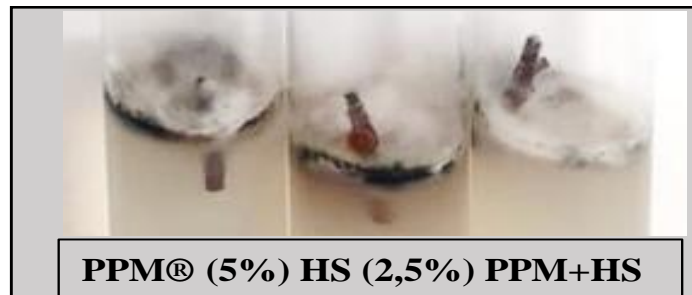
a concentração de 5% de hipoclorito foi mais eficiente na esterilização do que a de 2,5%. Porém, o uso de concentrações elevadas de hipoclorito de sódio pode causar toxidez e oxidação dos explantes. Outra explicação para ineficiência no combate da contaminação fúngica seria a contaminação endógena dos explantes, e neste caso a esterilização superficial não apresenta nenhuma eficácia.

O plant preservative mixture – PPM® é um biocida termoestável de largo espectro, que possui a capacidade de reduzir a contaminação microbiana na cultura de tecidos vegetal (COMPTON e KOCH, 2001). PPM® pode ser utilizado como um excelente substituto dos antibióticos no meio de cultura, por ser um produto estável ao calor, pode ser esterilizado em autoclave no próprio meio de cultura sem que perca sua atividade biocida (LUNGHUSEN, 1998). Além disso, a formação de bactérias resistentes ao PPM® é improvável, uma vez que esse produto inibe múltiplas enzimas do ciclo respiratório das bactérias (CHAPMAN e DIEHL, 1995).

Neste experimento, os dados obtidos demonstraram que durante o estabelecimento *in vitro* de explantes nodais de mangabeira, o uso do PPM® não diferiu em eficiência com relação ao uso de hipoclorito de sódio para as variáveis estudadas. No entanto, embora o uso de PPM® tenha se mostrado ineficiente no controle fúngico, não houve nenhuma contaminação bacteriana. O efeito positivo do uso de PPM® em meio de cultura no controle da contaminação bacteriana foi observado em gengibre vermelho (HAMIRAH et al., 2010), bambu (JIMINEZ et al., 2006), e por Niedz (1998), em seus experimentos com diversas culturas de citros, demonstrou que o PPM® pode ser utilizado nos meios de cultura para controlar, tanto contaminações bacterianas, quanto fúngicas, sem prejuízo para o material vegetal. Rihan et al. (2012) salienta da importância de utilizar PPM® em concentrações adequadas, sendo essas diferentes em cada espécie. Em concentrações altas o PPM® pode trazer efeitos negativos para o desenvolvimento do tecido vegetal, uma vez que é um biocida e apresenta efeitos fito-tóxicos. Já em concentrações muito baixas o PPM® pode não ser eficaz como biocida, sendo uma das prováveis explicações do porquê de não ter sido eficaz no controle de contaminação fúngica neste caso.

Com base nos resultados obtidos nesse experimento, pode-se admitir que os explantes utilizados provavelmente apresentavam contaminação endógena, não sendo eficaz realizar somente a esterilização superficial dos mesmos (Figura 2).

Figura 2. Aspecto visual dos explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), tratados com PPM® (5%), hipoclorito de sódio (2,5%) e a associação de ambos, aos 15 dias de cultivo *in vitro*. UFGD, Dourados/MS, 2018.



4 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos pode-se concluir que o estabelecimento de mangabeira via germinação *in vitro* a partir de sementes comerciais inviabiliza a germinação devido a contaminação fúngica e a perda de viabilidade. O uso dos agentes desinfetantes PPM® e hipoclorito de sódio não são efetivos no controle de contaminação fúngica dos explantes caulinares provindos de campo. Sendo assim, o maior entrave durante o estabelecimento *in vitro* de mangabeira, seja via sementes ou via explantes nodais caulinares encontra-se no elevado índice de contaminação fúngica explantes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5. ed. Flórida: Elsevier, 2005. 24 p.
- BARROS, D. I.; BRUNO, R. D. L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação 1. **Acta Tecnológica**, v. 5, n. 1, p. 31-43, 2010.
- BARROS, D.I. Tecnologia de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). 2006. 89f. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB
- BARROS, D.I.; BRUNO, R.L.A.; NUNES, H.V.; CABRAL, G.C.; PEREIRA, W.E.; MENDONÇA, R.M.N. Métodos de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.1, p.25-27, 2006.
- BASSAN, J.S.; REINIGER, L.R.S.; ROCHA, B.H.G.; SEVERO, C.R.P.; FLORES, A.V. . Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v.4, n.16, p.381-390, 2006.
- CERQUEIRA, G.; MACIEL, A.L. de R.; AZEVEDO, J.B.; MOREIRA, R. A.; FIGUEIREDO, F.C. Desinfestação de explantes foliares de café arábica (*Coffea arabica* L.) para estabelecimento *in vitro*. In: Jornada Científica e Tecnológica, 2014, Muzambinho. **Anais**. Pouso Alegre: IFSULDEMINAS, 2014. p. 1 - 6.
- CHAPMAN, J.S.; DIEHL, M.A. Methylchloroisothiazolone-induced growth inhibition and lethality in *Escherichia coli*. **Journal Of Applied Bacteriology**, p. 134-141, 1995.
- CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.6, p.1281-1287, 2005.
- COMPTON, M.E.; KOCH, J.M. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM)TM on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. **Springer**, v.37, n.2, p.259-261, 2001.
- CORDER, M.P.M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wil. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

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

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

ESPINDOLA, A.C de M.; FRANÇA, E.A.; NASCIMENTO JUNIOR, N.A. Efeito da profundidade de plantio e misturas de substratos na germinação e vigor das mudas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, p.165-168, 1993.

FERREIRA, E. G.; MENINO, I. B.; de SOUSA, M. F.; RÉGIS, T. K. O.; VASCONCELOS, G. C. Caracterização biométrica de plantas e físico-química de frutos de mangabeiras do litoral da paraíba. **Revista Campo do Saber**, v.4, n.4, 2018.

GOMES, W. P. Previlcanização do látex natural extraído da *Hancornia speciosa* gomes (Mangabeira) e da *Hevea brasiliensis* (seringueira). 2013. 97 f. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Engenharia, 2013.

GONÇALVES, G. A. S. Estabilidade da polpa de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) congelada e armazenada. 2017. 185f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GONÇALVES, M. R.; PEREIRA A. M. S.; FRANÇA, S. C.; BERTONI, B. W. Conservação *in vitro* de plantas medicinais. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, v.10, n.2, p.01-06, 2018.

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

HAMIRAH, M.N.;HAMSAWI, S.; BOYCE, P.C.; SIM, S.L. Micropropagation of red ginger (*Zingiber montanum* Koenig), a medicinal plant. **Asia Pacific Molecular Biology and Biotechnology**, v.18, n.1, p.127-130, 2010.

JIMÉNEZ, V, M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, v.86, n.3, p.389-395, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Paraná: Embrapa Florestas, 1992. 368 p.

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

LUNGHUSEN, J. An effective biocide for plant tissue culture. **Australian Horticulture**, v. 96, p. 45-48, 1998.

MACHADO, A.A.; SILVA, J.G.C.; SILVEIRA JUNIOR, P.; CONCEIÇÃO, A.R. **WinStat - Sistema de Análise Estatística para Windows versão**. Universidade Federal de Pelotas, 1999.

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

MELO, J.T.; RIBEIRO, J.F.; LIMA, V.L.G. Germinação de sementes de algumas espécies arbóreas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de sementes**, v.1, p. 8-12, 1979.

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

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, n.36, p.5-10, 2000.

NEVES, A.P. Introdução *in vitro* de explantes de segmentos nodais de *Dendrocalamus asper*. 2017. 36 f. **TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, UFFS, Laranjeiras do Sul, 2017.**

NIEDZ, R.P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **HortTechnology**, v.8, n.4, p. 598- 601, 1998.

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

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, v.9, n.1, p.13-37, 1999.

PEREIRA, A.C.; PEREIRA, A.B.; MOREIRA, C.C.; BOTION, L.M.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as potential anti-diabetic drug. *Journal of Ethnopharmacology*, v.161, p.30-35, 2015.

PEREIRA, E.B.C.; PEREIRA, A.V.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FIALHO, J.F. **Enxertia de Mudras de Mangabeira**. Brasília: Embrapa Cerrados (Documento/Embrapa Cerrados n. 65), 2002. 26p.

PEREIRA, G.A.; CORRÊA, L.D.S.; BOLIANI, A.C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande Naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.33, n.spe1, p.222-226, 2011.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A. de; SILVA, L.C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J.C.. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p.19-23, 2007.

PINHEIRO, C.S.R.; MEDEIROS, D.N. de; MACEDO, C.E.C. de; ALLOUFA, M.A.I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de cultura. **Revista brasileira de fruticultura**, v.23, n.2, p.413-416, 2001.

PINTO, R. J.; MAPELI, N.C.; CREMON, C.; SILVA, E.F.. Germinação e crescimento inicial de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em função de preparados homeopáticos *Carbo vegetabilis* e dias após o despolpamento para semeadura. **Agrarian**, v.7, n.24, p.244-250, 2014.

RIHAN, H.Z.; AL-ISSAWI, M; AL-SWEDI, F.; FULLER, M.P.. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. **Scientia horticulturae**, v.141, p.47-52, 2012.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, n.4, p.499-514, 1973.

SANTOS, M.P. dos; AGUIAR, R.A.; BRANDÃO, D.C. de; PIRES, L.L.; CASTRO, Y. de O.; SILVA, F.G.; NERI, L.M. da S.; PEREIRA, D.R.M.; CASTRO, J.R. de; SELEGUINI, A. Effect of seed desiccation and sucrose concentration on the *in vitro* establishment of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes var. *gardneri*) seedlings. **African Journal of Agricultural Research**, v.12, n.5, p.348-353, 2017.

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

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; SOUZA, V.C. de Micropropagação de *Celtis* sp. Controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SILVA, E. A.; OLIVEIRA, A. C.; MENDOÇA, V.; SOARES, F. M. Substratos na produção de mudas de mangabeira em tubetes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 2, p. 279-285, 2011.

SOARES, A.N.R.; SANTANA, J.G.S.; MELO, M.D.V.; MUNIZ, A.D.S. Germinação de sementes de mangaba submetidas à secagem. In: Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014, Aracaju. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2014.

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**, v.35, n. 1, p.152-157, 2011.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; STEIN, V.C.; NERY, F.C.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1847-1852, 2009.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 152 p.

STEIN, V.C.; PAIVA, R.; SOARES, F.P.; NOGUEIRA, R.C.; SILVA, L.C.; EMRICH, E.. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC.) T. D. Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31,p.1702-1708, 2007.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. **Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001.

VIEIRA NETO, R.D.; SILVA JUNIOR, J.F. da; LÉDO, A. da S. **Mangaba**. In: SANTOS-SEREJO, J.A. dos; DANTAS, J.L.L.; COELHO, C.V.S.; COELHO, Y. da S. (Org.). **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 323 - 338.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S.; SILVA, D.B. da; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil**. Ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica. 2010, 322 p.