

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal**

**Kennedy de Paiva Porfírio**

**Germinação, estaquia e micropropagação de *Xylopia aromatica*  
(Lam.) Mart.**

**Diamantina**

**2016**

**Kennedy de Paiva Porfírio**

**Germinação, estaquia e micropropagação de *Xylopiá aromática*  
(Lam.) Mart.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Grauação em Ciência Florestal, nível de mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miranda Titon**

**Diamantina**

**2016**

**Kennedy de Paiva Porfírio**

**Germinação, estaquia e micropropagação de *Xylopia aromatica*  
(Lam.) Mart**

Dissertação apresentada ao  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIA FLORESTAL -  
MESTRADO, nível de MESTRADO  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de MAGISTER  
SCIENTIAE EM CIÊNCIA  
FLORESTAL

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miranda Titon

Data da aprovação: 16/08/2016

Prof. Dr. ISRAEL MARINHO PEREIRA - UFVJM

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MICHELE APARECIDA PEREIRA DA SILVA - UFVJM

Prof. Dr. MARCELO LUIZ DE LAIA -  
UFVJM

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MIRANDA TITON - UFVJM

DIAMANTINA

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

P835g      Porfirio, Kennedy de Paiva  
Germinação, estaquia e micropropagação de *Xylopiya aromatica*  
(Lam.) Mart. / Kennedy de Paiva Porfirio. – Diamantina, 2016.  
71 p. : il.

Orientador: Miranda Titon

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Cerrado. 2. Espécie nativa. 3. Regulador de crescimento.  
4. Cultura de tecidos. 5. Dormência. I. Título. II. Universidade Federal dos  
Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 634.9**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pois sem ele, não estaria aqui agradecendo a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta etapa.

Aos meus pais, Manoel e Áurea, meus irmãos, Kenney, Kennya e minha filha Alice, que mesmo de longe apoiam e torcem sempre pelo meu sucesso. Amo todos vocês!

Aos amigos que fiz em Diamantina, em especial à turma norte e nordeste.

A toda equipe do Laboratório de Melhoramento Florestal e aos funcionários do Departamento de Engenharia Florestal da UFVJM, pela ajuda e suporte.

A minha orientadora Miranda Titon, pelos seus ensinamentos, dedicação de tempo e paciência ao longo das atividades.

Sua orientação foi de extrema importância, levarei sempre comigo o exemplo da excelente profissional e pessoa.

Aos funcionários do CIPEF, pelo auxílio durante a condução dos trabalhos.

À UFVJM, pela formação profissional e apoio financeiro.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Anglo American pelo apoio logístico durante a realização do trabalho.

Muito obrigado!

## RESUMO

PORFÍRIO, Kennedy de Paiva. **Germinação, estaquia e micropropagação de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.**, 2016. 71p. (Dissertação – Mestrado em Ciência Florestal). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver procedimentos de germinação, estaquia e micropropagação de *Xylopia aromatica*. Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em diamantina – MG, cujos trabalhos foram divididos em dois capítulos. No primeiro capítulo foram realizados oito experimentos. A germinação foi avaliada em quatro experimentos, onde sementes de *Xylopia aromatica*, separadas em lotes distintos quanto à densidade, foram submetidas à quebra de dormência utilizando GA<sub>3</sub> em diferentes concentrações (0; 25; 50; 100; 250; 500; e 1000 mg L<sup>-1</sup>), nos tempos de imersão 24 e 48 horas. Não ocorreu germinação durante os 210 dias de avaliação. Foram realizados quatro experimentos de estaquia, onde segmentos caulinares (com e sem folhas) e radiculares com classes de diâmetros distintas, foram imersos por 30 segundos em solução de AIB (0; 2000; 4000; 6000; 8000 e 10.000 mg L<sup>-1</sup>) a fim de induzir o enraizamento adventício. Foi avaliado o percentual de enraizamento durante 140 dias. Não houve enraizamento em nenhum dos experimentos, porém ocorreu brotações nas estacas caulinares que foram imersas nas concentrações de 2000, 4000 e 6000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. No segundo capítulo, foram realizados seis experimentos, que envolveram etapas de multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro*. Explantes foram submetidos a diferentes meios de cultura (MS e WPM), e concentrações de BAP (0,5 e 0,8 mg L<sup>-1</sup>), objetivando determinar o melhor meio de cultura e concentração de BAP para a multiplicação da espécie. Avaliou-se também, o alongamento em explantes com o uso de combinações de ANA e BAP e GA<sub>3</sub>, e enraizamento com o uso de AIB e ANA. O meio MS acrescido de 0,8 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi o que apresentou melhores resultados para a multiplicação de *Xylopia aromatica*. Na fase de alongamento, o GA<sub>3</sub> na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> foi o regulador de crescimento que apresentou melhor resultado em altura e número de folhas. No enraizamento, o AIB e o ANA não foram eficazes na indução de raízes, necessitando mais estudos relacionados à etapa de enraizamento para a espécie.

Palavras-Chave: Espécie nativa; regulador de crescimento; cultura de tecidos; dormência.

## ABSTRACT

PORFÍRIO, Kennedy de Paiva. **Germinação, estaquia e micropropagação de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.**, 2016. 71p. (Dissertation – Master in Forest Science). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

This study aimed to develop germination procedures, cutting and micropropagation *Xylopia aromatica*. The experiments were conducted in Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) in Diamantina - MG, whose works were divided into two chapters. In the first chapter were carried out eight experiments. Germination was evaluated in four experiments where *Xylopia aromatica* seeds, separated into separate lots for density, were submitted to dormancy breaking using GA<sub>3</sub> at different concentrations (0, 25, 50, 100, 250, 500, and 1000 mg L<sup>-1</sup>) under immersion for 24 and 48 hours. Not germinated during the 210 days of evaluation. Four cutting experiments were carried out where segments shoot (with and without leaves) and root with different diameter classes were immersed for 30 seconds in AIB solution (0; 2000; 4000; 6000; 8000 and 10,000 mg L<sup>-1</sup>) to induce adventitious roots. Rooting percentage was evaluated during 140 days. There was no rooting experiments, however sprouting occurred in the cuttings were dipped in concentrations of 2000, 4000 and 6000 mg L<sup>-1</sup> AIB. In the second chapter, we were conducted six experiments, involving multiplication steps, stretching and in vitro rooting. Explants were subjected to different culture medium (MS and WPM) and BAP (0,5 and 0,8 mg L<sup>-1</sup>), in order to determine the best medium and concentration of BAP for the multiplication of the species. It also evaluated the elongation explants using combinations of ANA and BAP and GA<sub>3</sub> and rooting using AIB and ANA. The MS medium plus 0.8 mg L<sup>-1</sup> BAP showed the best results for the multiplication of *Xylopia aromatica*. In the stretching step, the concentration of GA<sub>3</sub> at 5,0 mg L<sup>-1</sup> was the growth regulator showed better results in height and leaf number. Rooting, AIB and ANA were not effective in inducing roots, requiring more studies related to the rooting stage for the species.

Keywords: Native species; growth regulators; tissue culture; dormancy.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1:** Mortalidade em estacas caulinares de *Xylopiia aromatica* em função da presença ou ausência de folhas e concentrações de AIB.....27
- Figura 2:** Mortalidade em estacas radiculares de *Xylopiia aromatica* em função do diâmetro e concentrações de AIB.....28
- Figura 3:** Percentual de brotações emitidas em estacas caulinares de *Xylopiia aromatica*, em diferentes classes de diâmetro e concentrações de AIB, no período de junho a novembro de 2015.....29
- Figura 4:** Percentual de brotações emitidas em estacas caulinares de *Xylopiia aromatica* em diferentes classes de diâmetro e concentrações de AIB, no período de novembro de 2015 a abril de 2016.....29
- Figura 5:** Brotações em estacas caulinares *Xylopiia aromatica* aos 30 dias.....30

### Capítulo 2

- Figura 1:** Multiplicação de explantes de *Xylopiia aromatica* com 30 dias, em meio de cultura. A) MS + 0,5 BAP, B) MS + 0,8 BAP, C) WPM + 0,5 BAP e D) WPM 0,8 BAP.....48
- Figura 2:** Número de brotações emitidas em resposta aos meios de cultura e concentrações de BAP, no cultivo inicial e nos subcultivos 1 e 2 (sub1 e sub2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de significância dentro de um mesmo subcultivo.....49
- Figura 3:** Multiplicação de explantes de *Xylopiia aromatica* no subcultivo 2. A) MS + 0,5 BAP, B) MS + 0,8 BAP, C) WPM + 0,5 BAP e D) WPM 0,8 BAP.....49
- Figura 4:** Percentual de calos observados em explantes de *Xylopiia aromatica*, nas quatro classes (Ausente; Baixo; Médio e Alto) em resposta aos meios de cultura e concentrações de BAP no cultivo inicial (A), subcultivo 1 (B), subcultivo 2 (C) e quantificação de calos (D). 1) Ausente) 2) Baixo, 3) Médio e 4) Alto.....52
- Figura 5:** Multiplicação de explantes de *Xylopiia aromatica* no cultivo inicial, em função de concentrações de sacarose. A) 0 g L<sup>-1</sup>, B) 15 g L<sup>-1</sup>, C) 30 g L<sup>-1</sup> e D) 60 g L<sup>-1</sup>.....54



<b>Figura 6:</b> Valores médios observados para a característica número de brotações de explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> , em função das concentrações de sacarose, no cultivo inicial. ....	55
<b>Figura 7:</b> Percentual de calos observado em explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> , nas quatro classes de diâmetro (Ausente; Baixo; Médio e Alto) em resposta as concentrações de sacarose no cultivo inicial. ....	56
<b>Figura 8:</b> Multiplicação de explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> no subcultivo1 em função de concentrações de sacarose. A) 0 g L <sup>-1</sup> , B) 15 g L <sup>-1</sup> , C) 30 g L <sup>-1</sup> e D) 60 g L <sup>-1</sup> . ....	56
<b>Figura 9:</b> Valores médios observados para a característica número de brotações de explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> em função das concentrações de sacarose, no subcultivo 1. ....	57
<b>Figura 10:</b> Altura média dos explantes aos 70 dias de alongamento, em resposta aos tratamentos com BAP x ANA e GA <sub>3</sub> . Médias seguidas por mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. ....	58
<b>Figura 11:</b> Alongamento de explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> . A) 0,05mg L <sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L <sup>-1</sup> ANA, B) 0,1 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L <sup>-1</sup> ANA, C) 0,05 mg L <sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L <sup>-1</sup> ANA, D) 0,05 mg L <sup>-1</sup> BAP + 1,0 mg L <sup>-1</sup> ANA, E) 1,0 mg L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> e F) 5,0 mg L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> . ....	58
<b>Figura 12:</b> Número de folhas em explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> aos 70 dias de alongamento, em resposta aos tratamentos com BAP x ANA e GA <sub>3</sub> . Médias seguidas por mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. ....	59
<b>Figura 13:</b> Comprimento da maior folha dos explantes aos 70 dias de alongamento, em resposta às combinações de BAP x ANA e GA <sub>3</sub> em diferentes concentrações. Médias seguidas por mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. ....	60
<b>Figura 14:</b> Valores médios observados para a característica altura de explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> , em função das concentrações de GA <sub>3</sub> , aos 40 dias de alongamento. ....	61
<b>Figura 15:</b> Valores médios observados para a característica número de folhas de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> em função das concentrações de GA <sub>3</sub> , aos 40 dias de alongamento. ....	63
<b>Figura 16:</b> Valores médios observados para comprimento da maior folha em função das concentrações de GA <sub>3</sub> , para <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> aos 40 dias de alongamento. ....	64

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

<b>Tabela 1:</b> Composição do meio de cultura MS e WPM utilizados na micropropagação de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> .....	43
<b>Tabela 2:</b> Resultado da análise de variância para o número de brotações emitidas em explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> , em função dos meios de cultura e concentrações de BAP, nos três subcultivos .....	47
<b>Tabela 3:</b> Resultado da análise de variância para o número de brotações emitidas por explante de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> em função das concentrações de sacarose no cultivo inicial e subcultivo 1 .....	53
<b>Tabela 4:</b> Resultado da análise de variância para altura dos explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i>	57
<b>Tabela 5:</b> Resultado da análise de variância para número de folhas por explante aos 70 dias de alongamento de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> .....	59
<b>Tabela 6:</b> Resultado da análise de variância para comprimento da maior folha, aos 70 dias de alongamento de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> .....	60
<b>Tabela 7:</b> Resultado da análise de variância para a altura de explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> , aos 40 dias, em função das concentrações de GA <sub>3</sub> .....	61
<b>Tabela 8:</b> Resultado da análise de variância para número de folhas em explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> , aos 40 dias de alongamento, em função das concentrações de GA <sub>3</sub> .....	62
<b>Tabela 9:</b> Resultado da análise de variância para a característica comprimento da maior folha dos explantes de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i> aos 40 dias, em função das concentrações de GA <sub>3</sub> .....	63

## SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT .....	5
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
CAPÍTULO 1: Germinação e estaquia de <i>Xylopi</i> <i>a arom</i> <i>atica</i> (Lam) Mart.....	17
ABSTRACT .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	20
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	21
2.1 Material vegetal .....	21
2.2 Germinação de sementes de <i>Xylopi</i> <i>a arom</i> <i>atica</i> .....	22
2.2.1 Experimentos 1 e 2 – Influência do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) em diferentes concentrações e tempos de imersão na emergência de sementes.....	23
2.2.2 Experimento 3 e 4 – Influência do ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) em altas concentrações e tempos de imersão na emergência de sementes.....	23
2.3 Propagação vegetativa por estaquia .....	23
2.3.1 Experimento 5 – Enraizamento de estacas caulinares em função da presença ou ausência de folhas e concentrações de AIB .....	24
2.3.2 Experimento 6 – Enraizamento de estacas caulinares em função do diâmetro e concentrações de AIB .....	24
2.3.3 Experimento 7 – Enraizamento de estacas radiculares em função do diâmetro e concentrações de AIB .....	25
2.3.4 Experimento 8 – Enraizamento de estacas caulinares em função do diâmetro, concentrações de AIB e época do ano .....	25
2.4 Análises estatísticas .....	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
3.1 Germinação de sementes de <i>Xylopi</i> <i>a arom</i> <i>atica</i> – Experimentos 1, 2, 3 e 4.....	26
3.2 Propagação vegetativa por estaquia – Experimentos 5, 6, 7 e 8.....	27
4 CONCLUSÕES.....	33
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
CAPÍTULO 2: Micropropagação de <i>Xylopi</i> <i>a arom</i> <i>atica</i> (Lam.) Mart. ....	38
ABSTRACT .....	39
1 INTRODUÇÃO .....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
2.1 Material vegetal .....	41
2.2 Micropropagação de <i>Xylopi</i> <i>a arom</i> <i>atica</i> .....	42

2.2.1 Experimento 1 – Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Xylopi</i> a <i>aromatica</i> sob diferentes meios de cultura e concentrações de BAP .....	42
2.2.3 Experimento 3 – Alongamento com o uso de BAP, ANA e GA <sub>3</sub> .....	45
2.2.4 Experimento 4 – Alongamento com o uso de GA <sub>3</sub> .....	45
2.2.5 Experimento 5 – Enraizamento com o uso de AIB.....	46
2.2.6 Experimento 6 – Enraizamento com o uso de ANA .....	46
2.3 Análises estatísticas .....	47
3.1 Experimento 1 – Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Xylopi</i> a <i>aromatica</i> sob diferentes meios de cultura e concentrações de BAP .....	47
3.3 Experimento 3 – Alongamento com o uso de BAP, ANA e GA <sub>3</sub> .....	57
3.4 Experimento 4 – Alongamento com o uso de GA <sub>3</sub> .....	61
3.5 Experimento 5 e 6 – Enraizamento <i>in vitro</i> utilizando AIB e ANA .....	64
4 CONCLUSÕES.....	65
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	71

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Annonaceae possui uma distribuição pantropical, com cerca de 130 gêneros, possuindo em média 2.200 espécies, estando registrado 33 gêneros no Brasil (SOUZA; LORENZI, 2008). Muito abundante no Cerrado brasileiro, constituída por árvores e arbustos, apresenta ampla distribuição geográfica, de grande importância, em muitos casos desconhecidas ou pouco utilizadas (PONTES, 2004; SCALOPPI JUNIOR et al., 2013).

Comumente, essas espécies propagam-se via sexual com polinização cruzada, gerando grande diversidade genética. Porém, na maioria das espécies dessa família, ocorre uma desuniformidade no crescimento e frutificação, reduzindo sua utilização na produção de mudas para diversos fins.

A propagação por sementes ou sexuada é o principal método pelo qual as plantas se reproduzem na natureza e também um dos mais eficientes, sendo amplamente utilizada na propagação de plantas cultivada (HARTMANN et al., 2011). Alguns fatores podem afetar a germinação de sementes. Entre os principais, estão a dormência e qualidade das sementes, o conteúdo de água, o ambiente em que as sementes são submetidas e temperatura (FACHINELLO et al., 2005).

A propagação vegetativa surge como uma alternativa viável para a multiplicação de material vegetal de espécies nativas, que por ventura ocorram entraves com relação à sua propagação seminal, para fins comerciais e conservação de recursos genéticos (OLIVEIRA et al., 2013).

A estaquia é uma técnica de propagação vegetativa amplamente empregada em espécies de valor comercial como o eucalipto, podendo também ser viável para propagar espécies nativas, auxiliando no resgate e conservação de recursos florestais (DIAS et al., 2012).

Portanto, para as espécies que não se tem estudos e técnicas de propagação vegetativa definida, utiliza-se como base métodos já utilizados na estaquia do gênero *Eucalyptus*.

Vários fatores podem influenciar o enraizamento das estacas, tanto intrínsecos, relacionados à própria planta, quanto extrínsecos, ligados às condições ambientais, (RAMOS et al., 2003). FERRI et al. (1996) ressaltam que são fatores importantes na propagação vegetativa por meio de estacas, a época de coleta das estacas e o uso de reguladores de crescimento, que visam estabelecer um equilíbrio hormonal adequado ao enraizamento.

Alguns outros fatores podem interferir durante o processo de formação de raízes, sendo exemplos a baixa capacidade genética das árvores matrizes para a formação de raízes

adventícias, a utilização de propágulos com tamanho inadequado, idade fisiológica desfavorável ao enraizamento, propágulos maduros com baixo grau de juvenilidade (XAVIER et al., 2013).

A juvenilidade dos propágulos pode exercer muita influência durante o enraizamento de estacas, sendo que a formação de raízes adventícias diminui à medida que avança a idade da planta matriz fornecedora de propágulos (HARTMANN et al., 2011).

Para a formação de raízes adventícias em estaca, é necessária a presença de certos níveis de substâncias de crescimento natural das plantas, sendo umas mais favoráveis que outras. Várias substâncias, quando aplicadas exogenamente, promovem ou inibem a iniciação de raízes adventícias, dependendo da espécie, do estado de maturação, dentre outros fatores (XAVIER et al., 2013).

Existem diversas substâncias com propriedades reguladoras de crescimento vegetal, sendo as auxinas as de maior interesse no enraizamento de estacas lenhosas (HARTMANN et al. 2011).

As auxinas, são consideradas as principais substâncias para induzir o enraizamento adventício, principalmente em espécies de difícil enraizamento. Em meio à todas as auxinas, a mais utilizada e a que tem apresentado melhores resultados para a maioria das espécies florestais é o ácido indol-3butírico (AIB) (VALMORBIDA et al., 2008).

O AIB tem apresentado maior eficiência na promoção de raízes adventícias em estacas de espécies florestais, visto sua menor mobilidade e maior estabilidade química no interior da estaca. A concentração pode variar de 20 a 10.000 mg L<sup>-1</sup>, sendo as maiores concentrações utilizadas em estacas lenhosas, de enraizamento mais difícil (XAVIER et al., 2013).

Pesquisas relativa à clonagem de espécies florestais ainda contemplam uma baixa quantidade de espécies nativas do Brasil. Atualmente, a micropropagação de espécies nativas destina-se à genótipos de difícil propagação pelos métodos tradicionais (FICK et al., 2007; BORGES JÚNIOR et al. 2014). Apesar de pesquisas quanto à micropropagação de espécies florestais nativas ainda ser reduzida, deve-se considerar a importância destes trabalhos, os quais contribuem significativamente para a produção da espécie alvo, possibilitando sua multiplicação rápida em larga escala e curto espaço de tempo (MIRANDA, 2015).

A *Xylopia aromatica* é uma planta semidecídua, heliófita, pioneira e seletiva xerófila, pertencente à família Annonaceae, característica do Cerrado. É uma espécie arbórea conhecida como pindaíba, pimenteira e pimenta de macaco, dentre outros nomes populares. Ocorre naturalmente no Cerrado, nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, São Paulo e Mato Grosso do Sul., Possui grande potencial paisagístico e madeireiro, é indicada especialmente

para o plantio em áreas degradadas situadas em terrenos pobres e secos. No estado de São Paulo é recomendada para a recuperação de áreas degradadas por meio da resolução SMA n° 47/2003, (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 1992; SILVA et al., 2005; SÃO PAULO, 2003). A espécie é muito frequente em sua área de ocorrência, promovendo regeneração natural e alta dominância no terreno.

A pesar da grande variedade de espécies encontradas no Cerrado, a *Xylopia aromatica*, foi uma das 38 espécies de maior ocorrência em 50% ou mais na composição da vegetação lenhosa de Cerrado, em 376 áreas analisadas dentre um total de 951 espécies (RATTER et al. 2003).

Em condições de laboratório e de viveiro, a germinação das sementes não ocorre ou é irrisória, mesmo quando são utilizados métodos para superar a dormência (CASTELLANI et al., 2000), revelando que os mecanismos fisiológicos de germinação ainda não foram elucidados.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de germinação, estaquia e micropropagação de *Xylopia aromatica*. O primeiro capítulo, “Germinação e estaquia de *Xylopia aromatica* (Lam) Mart.” apresenta experimentos que objetivam avaliar a influência da densidade de sementes e do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na germinação e desenvolver metodologia de enraizamento adventício em estacas caulinares e radiculares de árvores adultas de *Xylopia aromatica*. O segundo capítulo, “Micropropagação de *Xylopia aromatica* (Lam) Mart.”, teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação, visando à produção de mudas, avaliando as condições de cultivo *in vitro*, como meio de cultura, concentração de sacarose e reguladores de crescimento mais adequados para a espécie, nas fases de multiplicação, alongamento e enraizamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M. & RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPAC/PAC, 1998. 464p.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de Acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.4, p.493-498, 2004.

CASTELLANI, E.D.; DAMIÃO-FILHO, C.R.; AGUIAR, I.B. & PAULA, R.C. Efeito da redução do endosperma e da aplicação de ácido giberélico na germinação de sementes de *Xylopia sericea* St.Hil. (Annonaceae). In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE FLORESTA, 6, Porto Seguro, 2000. **Resumos Técnicos**. Rio de Janeiro: Instituto Ambiental Biosfera, 2000. p.107-108.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1978. v.5, p.234.

DIAS, P.C; OLIVEIRA, L.S; XAVIER, A; WENDILING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462. 2012.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Eds.). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. P. 69-109.

FERRI, V. C; KERSTEN, E; MACHADO, A. A. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas semilenhosas de kiwi (*actinidia deliciosa*, a.chev.) cultivar hayward. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, nº 1, 63-66, 1996.

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

HARTMANN, H. T; KESTER, D. E; DAVIES JR, F. T; GENEVE, R. L. Hartmann and Kester's **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall. 2011. 915 p.



- LORENZI, R. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 352p.
- LUCHI, A. E; SILVA, L. P.S; MORAES, M.A. Anatomia comparada do lenho de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. em áreas de Cerrado e de plantação de *Pinus elliottii* Engelm. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.4, p.809-820. 2005.
- MIRANDA, N. A. **Micropropagação de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)**. 2015 67 f. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ciência Florestal), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.
- NEVES, T. S.; CARPANEZZI, A. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; MARENCO, R. A. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1699-1705, 2006.
- 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.
- PONTES, A.F.; BARBOSA, M.R.V. & MAAS, P.J.M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.281-293, 2004.
- RAMOS, J. D.; PIO, R. CHALFUN, N.; COLEHO, J.; CONTIJO, T.; CARRIJO, E. Enraizamento de estacas apicais de figueira tratadas com sacarose e ácido indolbutírico por imersão rápida. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.9, n. 1, p. 35-38, 2003.
- RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany** v. 60, p. 57-109. 2003.
- RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L.; MELO, J. T.; ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. Propagação de frutíferas nativas do Cerrado. In: PINTO, A. C. **Produção de mudas frutíferas sob condições do ecossistema de Cerrados**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55-80. 1996.
- SÃO PAULO (ESTADO). SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Resolução SMA n.47, de 26 de novembro de 2003. *Diário Oficial*, São Paulo, 27 de novembro de 2003.
- SCALOPPI JUNIOR, E.J.; MARTINS, A. B.G. Anonáceas: Principais porta-enxertos para produção de mudas. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 10, n. 2, 2013.

SILVA, M. P. S.; BARROSO, D. G.; SOUZA, J. S.; FERREIRA, D. A.; CARNEIRO, J. G. A. Enraizamento de miniestacas e produtividade de minicepas de cedro australiano manejadas em canaletões e tubetes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 4, p. 703-713, 2012.

SILVA JÚNIOR, M.C.; SANTOS, G.C.; NOGUEIRA, P.E.; MUNHOZ, C.B.R. & RAMOS, A.E. 2005. **100 Árvores do Cerrado Guia de Campo**. Brasília, DF, Rede de Sementes do Cerrado.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica e sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C. S. F.; LESSA, A. O.; SALERNO, A. R. Enraizamento de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss (catigua) em diferentes estações do ano. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 435-442, 2008.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279p.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiros e produção de mudas**. Colombo, Embrapa Florestas, 2002. 48p.

## **CAPÍTULO 1: Germinação e estaquia de *Xylopia aromatica* (Lam) Mart.**

**Resumo** - A *Xylopia aromatica* é uma espécie pertencente à família Annonaceae, comumente encontrada em áreas de Cerrado, com importância ecológica, ambiental e potencial medicinal. Apresenta propagação sexuada, contudo a germinação em viveiro não ocorre ou é baixa, devido a condições intrínsecas da espécie. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da densidade de sementes e do ácido giberélico na germinação e desenvolver metodologia de enraizamento adventício em estacas caulinares e radiculares de árvores adultas de *Xylopia aromatica*. As sementes e estacas foram coletadas em árvores matrizes localizadas em Conceição do Mato Dentro - MG. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento Florestal e no Centro de Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF), do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em Diamantina - MG. Para a desinfestação e semeadura, as sementes foram imersas em álcool 70%, em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) e enxaguadas com água deionizada e autoclavada. Posteriormente, foram separadas em duas classes de densidade e imersas em solução de ácido Giberélico ( $GA_3$ ) em concentrações de 0; 25; 50 e 100  $mg L^{-1}$  e semeadas em caixas gerbox utilizando como substrato areia lavada. Foram realizados dois experimentos simultâneos, sendo no primeiro avaliando tempo de imersão por um período de 24 horas e no segundo por 48 horas. No terceiro e quarto experimento, foram realizados ajustes com relação a concentrações de  $GA_3$  (0; 250; 500 e 1000  $mg L^{-1}$ ). Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 4x2 (4 concentrações de  $GA_3$  e duas densidades de sementes) em todos os experimentos. As avaliações foram realizadas semanalmente durante 210 dias. Com relação à estaquia, foram realizados quatro experimentos utilizando estacas caulinar e radicular. No primeiro experimento, as estacas foram separadas em estacas com ausência e presença de folhas; e nos demais foram separadas quanto ao seu diâmetro. Foram avaliadas as concentrações de 0, 2000, 4000 e 6000  $mg L^{-1}$  de AIB em três experimento e no quarto experimento concentrações de 0; 6000; 8000 e 10000  $mg L^{-1}$ . O substrato utilizado foi 60% de vermiculita expandida, 20% casca de arroz carbonizada e 20% Bioplant® e a fase de enraizamento ocorreu em casa de vegetação. As avaliações foram realizadas semanalmente, durante 140 dias, avaliando-se a emissão de brotações e de raízes. Não ocorreu germinação em nenhum dos experimentos. Nos experimentos de estaquia, ocorreu emissão de brotações em estacas caulinares, no entanto não se verificou a emissão de raízes.

Palavras-chave: Cerrado, dormência, ácido giberélico, enraizamento adventício.

## ABSTRACT

The *Xylopia aromatica* is a species of the Annonaceae family, generally found in Cerrado areas, ecological, environmental and medicinal potential. Displays sexual propagation, however, the nursery germination is low or does not occur due to inherent conditions of species. This study aimed to evaluate the influence of seed density and gibberellic acid on germination and rooting develop methodology in adventitious shoot and root cuttings of adult trees *Xylopia aromatica*. The seeds and cuttings were collected from mother trees located in Conceicao do Mato Dentro - MG. The experiments were conducted at the Forest Improvement Laboratory and Integrated Center of Forest Species Propagation (CIPEF), Department of Forest Engineering, Universidade Federal Vales do Jequitinhonha and Mucuri (UFVJM) in Diamantina - MG. For disinfection and sowing, seeds were immersed in 70% alcohol, sodium hypochlorite and 2.5% (v / v) and rinsed with deionized water and autoclaved. Subsequently, they were separated into two density class and immersed in gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) at concentrations of 0; 25; 50 and 100 mg L<sup>-1</sup> and seeded in boxes using gerbox washed sand as substrate. Two simultaneous experiments were performed, evaluating the first immersion time for 24 hours and second for 48 hours. In the third and fourth experiment, adjustments were made with respect to GA<sub>3</sub> concentrations (0, 250, 500 and 1000 mg L<sup>-1</sup>). The experimental design adopted was randomized blocks in 4x2 factorial design (4 concentrations of GA<sub>3</sub> and two densities of seed) in all experiments. The evaluations were performed weekly for 210 days. With regard to cutting, four experiments were conducted using stem and root cuttings. In the first experiment, the stakes were separated into piles with the absence and presence of leaves; and the other were separated as to its diameter. We evaluated the concentrations of 0, 2000, 4000 and 6000 mg L<sup>-1</sup> AIB in three experiments and in the fourth experiment concentrations of 0; 6000; 8000 and 10000 mg L<sup>-1</sup>. The substrate used was 60% of expanded vermiculite 20% carbonized rice husk and 20% Bioplant® and rooting phase occurred in the greenhouse. The evaluations were performed weekly for 140 days evaluating the emission of shoots and roots. Not germinated in any of the experiments. In cutting experiments occurred shoot emission in cuttings, however not found to emit roots.

**Keywords:** Cerrado, dormancy, gibberellic acid, adventitious rooting.

## 1 INTRODUÇÃO

A propagação de espécies nativas apresenta grande importância, principalmente devido a questões ambientais (ARAUJO NETO et al., 2003), ocasionando demanda por mudas dessas espécies, o que requer o desenvolvimento de pesquisas nessa área de conhecimento (SANTOS; AGUIAR, 2000). Nesse contexto, diversos gêneros e espécies apresentam-se como alternativas para o reflorestamento ambiental, aliados ao seu potencial de uso múltiplo, como para fins alimentícios, medicinais, entre outros usos potenciais.

O gênero *Xylopia* é reconhecido por apresentar propriedades medicinais, dentre as quais destacam-se as atividades antimicrobiana e citotóxica (ASEKUN; KUNLE, 2004). Entre seus representantes, a *Xylopia aromatica* tem recebido destaque no cenário ambiental, sendo recomendada para a recuperação de áreas degradadas no estado de São Paulo, por meio da resolução SMA nº 47/2003 (SÃO PAULO, 2003).

A espécie possui distribuição geográfica que varia entre América Central e Brasil, sendo muito comum em áreas de Cerrado (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 1995). Análises preliminares das folhas revelam presença de saponinas, taninos e alcaloides (SILVA et al., 1976), e óleos essenciais (FOURNIER et al., 1994). É utilizada como agente diurético natural sendo estudada para tratamento de edema de pele (TAKAHASHI, 2006).

Apresenta crescimento e maturação das folhas durante estação chuvosa entre dezembro e fevereiro (VARANDA et al., 2008). Sua reprodução é favorecida por uma maior incidência de luz (LANDENBERGER; OSTERGREN, 2002), e as sementes apresentam padrões fenológicos anuais.

Sua inflorescência é formada por fascículos com 3 a 4 flores em cada axila foliar (DIAS, 1998), apresenta síndrome de polinização de cantarofilia, predominante alógama, com alto grau de auto-incompatibilidade devido a dicogamia do tipo protoginia (COSTA, 1988). Os frutos são do tipo multifolículos, aromáticos, com dispersão de sementes feita provavelmente por pássaros e besouros, que são atraídos pela cor avermelhada da cápsula quando aberta e consomem as sementes com arilo suculento (ALMEIDA et al., 1998).

Suas sementes apresentam cerca de 7 mm de comprimento (CASTELLANI et al., 2001), possuem embrião com dormência morfofisiológica (SAUTU et al., 2007), dificultando sua propagação em viveiro, fazendo-se necessário a utilização de hormônio para a superação da dormência.

As giberelinas (GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub>) tem sido indicadas na superação da dormência de *Xylopia aromatica* (SOCOLOWSKI; CICERO, 2008). Sabe-se que este grupo estimula a germinação em diversas espécies florestais, mas cada espécie interage com determinada giberelina, promovendo a reativação de várias enzimas hidrolíticas que estão envolvidas na solubilização das reservas do endosperma (THOMAS et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2010).

Sementes com maior densidade, geralmente apresentam elevada capacidade de germinação, aparentemente por serem bem formadas e possuir reservas nutritivas em maior quantidade, proporcionando maior probabilidade de sucesso no estabelecimento e desenvolvimento de plântulas (HAIG; WESTOBY, 1991; KHAN, 2004), de acordo com o observado para a *Xylopia aromatica* (SOCOLOWSKI; CICERO, 2011).

Aliado ao uso de promotores da germinação de sementes, a propagação clonal representa uma alternativa para espécies que apresentam limitações na propagação sexuada, sendo utilizada para espécies florestais, possibilitando a multiplicação, conservação e pesquisas em geral com as técnicas de enxertia, estaquia e micropropagação amplamente difundidas (WENDLING et al., 2006).

A propagação por estaquia, é considerada como uma importante ferramenta do melhoramento de espécies lenhosas e herbáceas (EHLERT et al., 2004). A aplicação de reguladores vegetais tem sido utilizada com bastante frequência, buscando melhorar o enraizamento de estacas, principalmente com o auxílio do ácido indolbutírico (BIASI, 2002).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da densidade de sementes e do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na germinação e desenvolver metodologia de enraizamento adventício em estacas caulinares e radiculares de árvores adultas de *Xylopia aromatica*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no período de julho de 2015 a março de 2016, no Laboratório de Melhoramento Florestal e no Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF) do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, em Diamantina, Minas Gerais.

### **2.1 Material vegetal**

Sementes e estacas de *Xylopia aromatica* foram coletadas em uma área cedida pela empresa Anglo American, no município de Conceição do Mato Dentro, Minas Gerais,

localizada sob as coordenadas 19° 2' 13" S, 43° 25' 30" W, a 167 km de Belo Horizonte – MG, onde apresenta uma grande ocorrência do gênero *Xylopia*.

A coleta das sementes foi realizada em 30 árvores matrizes, com estado fitossanitário isento de pragas ou doenças. Os frutos foram coletados quando maduros e anteriormente à dispersão, e acondicionados em sacos plásticos até o momento do beneficiamento. O beneficiamento das sementes foi manualmente e a secagem ocorreu em temperatura ambiente, por um período de 6 dias, e logo em seguida foram armazenadas em câmara fria, com temperatura de 6°C e umidade relativa do ar de 40%.

As estacas foram coletadas em 30 árvores matrizes, visualmente isentas de pragas ou doenças, no período da manhã. As estacas caulinares foram retiradas de ramos da porção mediana das copas das árvores e, para as radiculares, foi aberta uma trincheira próximo ao tronco da árvore, acompanhando o seguimento das raízes.

## **2.2 Germinação de sementes de *Xylopia aromatica***

As sementes, após beneficiadas, foram desinfestadas inicialmente sendo lavadas em água deionizada e autoclavada, seguida de imersão em álcool 70% durante 30 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) com 4 a 5 gotas de detergente comercial Tween20 por 100 ml de solução durante 20 minutos, e então enxaguadas com água deionizada e autoclavada por quatro vezes.

Na instalação dos experimentos, as sementes foram selecionadas através do teste densimétrico, que consistiu em imersão em água deionizada e autoclavada em um becker de 1 litro por um período de 30 minutos. Em seguida foram separadas em dois lotes, sendo que as sementes que imergiram foram consideradas de maior densidade e as que emergiram consideradas de menor densidade.

As sementes foram semeadas em caixas gerbox, previamente lavadas e esterilizadas com hipoclorito de sódio a 5% e álcool 70%, com dimensões de 11,0 x 11,0 x 3,0 cm. O substrato utilizado foi areia lavada e esterilizada em estufa a 200°C por um período de 2 horas. Após a semeadura, as gerbox foram mantidas em câmara de germinação (BOD - Câmara de Germinação com fotoperíodo – SP 225) com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 30 °C, e a umidade do substrato foi mantida através de verificações diárias.

Em todos os experimentos de superação de dormência, a avaliação foi feita semanalmente, durante 210 dias, observando-se a emergência das sementes.



### **2.2.1 Experimentos 1 e 2 – Influência do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) em diferentes concentrações e tempos de imersão na emergência de sementes**

Foram realizados dois experimentos simultâneos, sendo no primeiro avaliado o tempo de imersão em solução de GA<sub>3</sub> durante 24 horas e no segundo o tempo de imersão de 48 horas.

Em ambos experimentos, foram utilizadas as concentrações de 0; 25; 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> combinadas com duas densidades de sementes (sementes que emergiram e sementes que imergiram no teste densimétrico).

Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 4x2 (4 concentrações de GA<sub>3</sub> e 2 densidades de sementes), com quatro blocos contendo 25 sementes por tratamento, totalizando 800 sementes por experimento.

### **2.2.2 Experimento 3 e 4 – Influência do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) em altas concentrações e tempos de imersão na emergência de sementes**

Foram realizados dois experimentos simultâneos, sendo no primeiro avaliado o tempo de imersão em solução de GA<sub>3</sub> durante 24 horas e no segundo o tempo de imersão de 48 horas.

Em ambos experimentos, foram utilizadas as concentrações de 0; 250; 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> combinadas com duas densidades de sementes (sementes que emergiram e sementes que imergiram no teste densimétrico).

Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 4x2 (4 concentrações de GA<sub>3</sub> e 2 densidades de sementes), com quatro blocos contendo 25 sementes por tratamento, totalizando 800 sementes por experimento.

## **2.3 Propagação vegetativa por estaquia**

Durante a coleta, as estacas foram mantidas em caixa de isopor, sobre uma camada de gelo, coberta com jornal, até o momento do estaqueamento, para evitar desidratação e oxidação dos tecidos no local do corte.

As estacas foram coletadas em Conceição do Mato Dentro, ao longo do dia, e conduzidas para o CIPEF, em Diamantina, a uma distância de 150 Km. O estaqueamento ocorreu na manhã seguinte, 24 horas aproximadamente após coletadas.

Após a transferência para o CIPEF, as estacas caulinares e radiculares foram lavadas em água corrente. O estaqueamento foi efetuado em tubetes de 280cm<sup>3</sup> e acondicionado em bandejas plásticas, com capacidade para 54 unidades. O substrato utilizado foi uma mistura de 60% de vermiculita expandida; 20% casca de arroz carbonizada e 20% Bioplant®. A fase de enraizamento ocorreu em casa de vegetação coberta com filme de PVC de 150 micras e sombrite com redução de 50% da luminosidade, equipada com sistema de irrigação por aspersão, com acionamento de 30 em 30 minutos por um período de 12 horas durante o dia, com vazão de 7 litros por hora.

Os experimentos 5, 6 e 7 foram conduzidos nos meses de junho a novembro de 2015, enquanto o experimento 8 foi conduzido nos meses de novembro de 2015 a abril de 2016.

As avaliações foram realizadas semanalmente, durante um período de 140 dias.

### **2.3.1 Experimento 5 – Enraizamento de estacas caulinares em função da presença ou ausência de folhas e concentrações de AIB**

Foram utilizadas estacas retiradas a partir de ramos caulinares, de 20 cm de comprimento e com diâmetro médio de 5 mm, sendo que uma parte das estacas tiveram um par de folhas no ápice, enquanto outras, totalmente desfolhadas. As estacas tiveram a base mergulhada em solução de ácido-indolbutírico (AIB), nas concentrações de 0, 2000, 4000 e 6000 mg L<sup>-1</sup>, durante 30 segundos e imediatamente, foram estaqueadas em substrato.

Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 2x4 (2 tipos de estacas, com e sem folhas e 4 concentrações de AIB), com 4 blocos e 10 estacas por tratamento.

Foram realizadas avaliações semanais da emissão de brotações na parte aérea e ao final do experimento a emissão de raízes.

### **2.3.2 Experimento 6 – Enraizamento de estacas caulinares em função do diâmetro e concentrações de AIB**

Foram utilizadas estacas confeccionadas a partir de ramos caulinares, de 20 cm de comprimento e com diâmetro médio de (0 a 5 mm e 10 a 15 mm). As estacas, tiveram a base mergulhada em solução de AIB, nas concentrações de 0, 2000, 4000 e 6000 mg L<sup>-1</sup>, durante 30 segundos e imediatamente, foram estaqueadas em substrato.

Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 2x4 (2 tipos de estacas com diferentes diâmetros e 4 concentrações de AIB), com 4 blocos e 10 estacas por tratamento.

Foram realizadas avaliações semanais da emissão de brotações na parte aérea e ao final do experimento a emissão de raízes.

### **2.3.3 Experimento 7 – Enraizamento de estacas radiculares em função do diâmetro e concentrações de AIB**

Raízes foram seccionadas em estacas de 10 a 15 cm de comprimento, e classificadas quanto ao diâmetro (10 a 15 mm, e 20 a 25 mm). A porção apical da raiz não foi utilizada no preparo das estacas. As estacas tiveram a base mergulhada em solução de AIB, nas concentrações de 0, 2000, 4000 e 6000 mg L<sup>-1</sup>, durante 30 segundos e imediatamente, foram estaqueadas em substrato, sendo a base da estaca radicular, a porção mais próxima da coifa.

Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 2x4 (2 tipos de estacas com diferentes diâmetros e 4 concentrações de AIB), com 4 blocos e 10 estacas por tratamento.

Ao final do experimento foi avaliada a emissão de raízes.

### **2.3.4 Experimento 8 – Enraizamento de estacas caulinares em função do diâmetro, concentrações de AIB e época do ano**

Este experimento consistiu em modificações com relação ao experimento 6 (descrito no item 2.3.2) no que se referiu à época do ano (novembro a abril), ao diâmetro médio das estacas (de 0 a 10 mm e 15 a 20 mm) e ainda com relação às concentrações de AIB utilizadas (0, 6000, 8000 e 10.000 mg L<sup>-1</sup>).

Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 2x4 (2 tipos de estacas com diferentes diâmetros e 4 concentrações de AIB), com 4 blocos e 10 estacas por tratamento.

Foram realizadas avaliações semanais da emissão de brotações na parte aérea e ao final do experimento a emissão de raízes.

## 2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos de germinação e de enraizamento de estacas foram submetidos à análise descritiva.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Germinação de sementes de *Xylopiá aromática* – Experimentos 1, 2, 3 e 4

Durante os 210 dias dos experimentos, não correu germinação em nenhum dos tratamentos, evidenciando que a espécie apresenta limitações no processo de germinação.

As concentrações de GA<sub>3</sub> utilizadas, bem como os tempos de imersão, podem não ter sido adequados às exigências das sementes da espécie.

SOCOLOWSKY et al. (2011), utilizando GA<sub>4</sub> + GA<sub>7</sub> na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup> e imersão por 48 horas, obtiveram 78% de germinação com 49% de plântulas normais de *Xylopiá aromática*, evidenciando que a interação do GA<sub>4</sub> + GA<sub>7</sub> apresenta melhores resultados quando comparados ao GA<sub>3</sub> utilizado no presente trabalho.

Outra possível explicação para o fato de não ocorrer a germinação, pode estar associado às condições ambientais no local de ocorrência da espécie, onde foram coletadas as sementes, como temperatura, umidade, fertilidade do solo, estratégias de reprodução, agentes polinizadores dentre outras, que podem ter influenciado negativamente durante a formação das sementes, produzindo sementes sem embrião.

LOBO et al. (2007), fazem considerações que nas Anonáceas ocorrem problemas de polinização, resultando na formação de sementes sem embriões.

No presente estudo não foi possível avaliar o efeito da densidade das sementes sobre a germinação e na qualidade das plântulas formadas. A variação do peso das sementes pode afetar a germinação e características das mudas (SCHAAL, 1980). Sementes de *Xylopiá aromática* que apresentam maior peso, tendem a possuir endosperma ou cotilédones mais desenvolvidos, contendo maiores reservas de energia favorecendo assim a germinação (SOCOLOWSKI et al., 2011).

### 3.2 Propagação vegetativa por estaquia – Experimentos 5, 6, 7 e 8

Nos experimentos 5 (Figura 1) e 7 (Figura 2), não foi possível realizar nenhuma avaliação, devido a morte das estacas durante os 30 primeiros dias de avaliação.



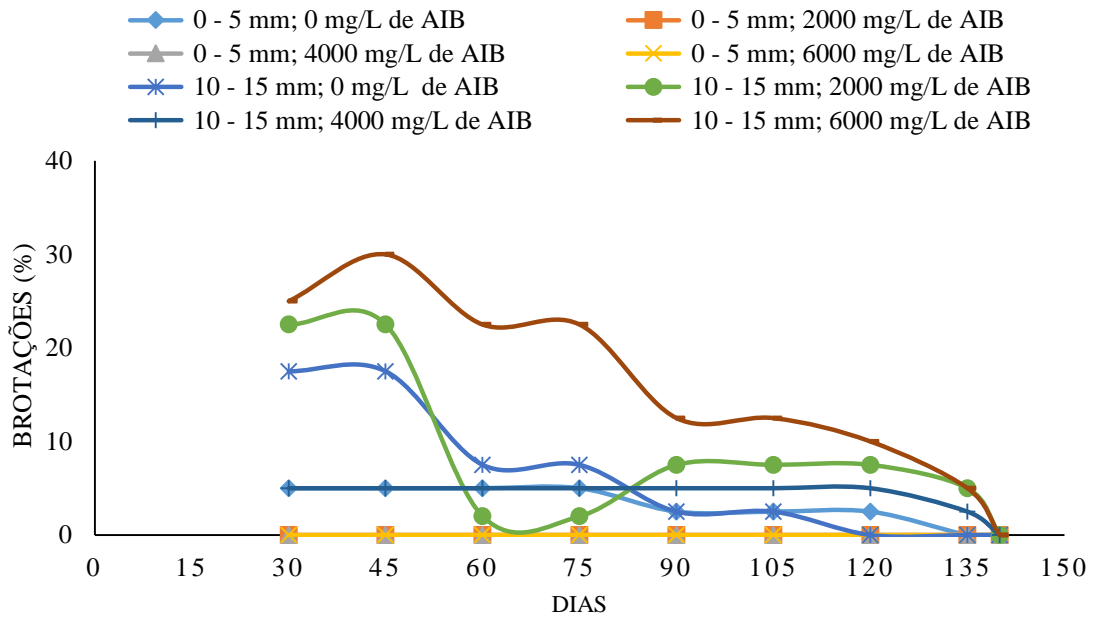
**Figura 1:** Mortalidade em estacas caulinares de *Xylopiá aromática* em função da presença ou ausência de folhas e concentrações de AIB.



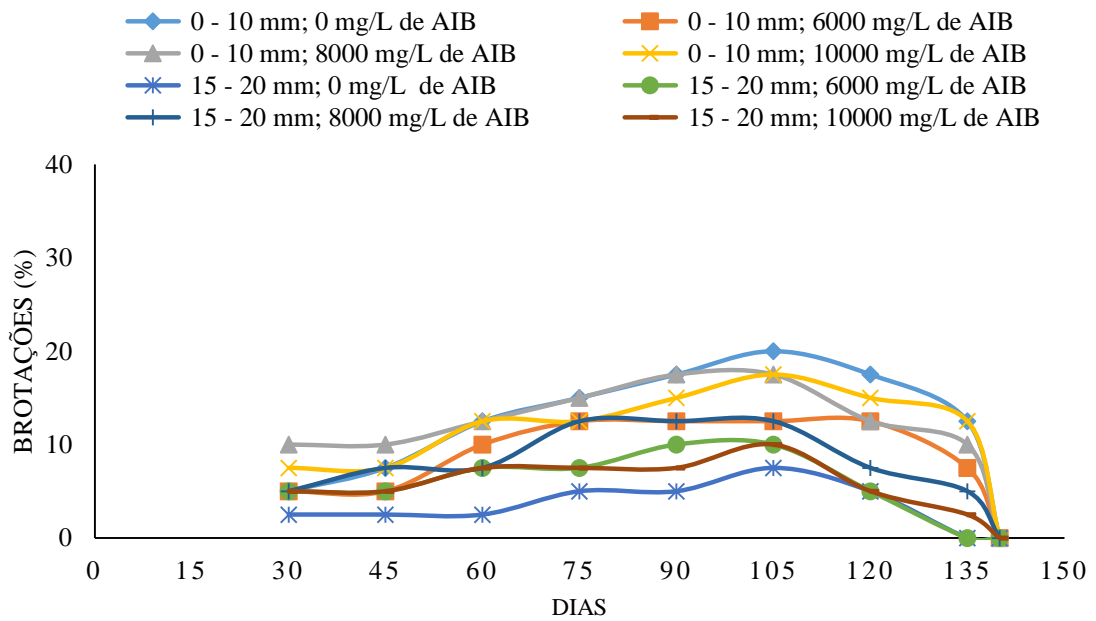
**Figura 2:** Mortalidade em estacas radiculares de *Xylopia aromatica* em função do diâmetro e concentrações de AIB.

Verificou-se aos 30 dias de avaliação dos experimentos 6 e 8, que as estacas caulinares iniciaram a emissão de brotações (Figuras 3, 4 e 5). No experimento 6 (Figura 3), dos 30 aos 75 dias, houve surgimento e crescimento das brotações, e a partir dos 75 dias verificou-se a murcha e a morte das brotações nas estacas, até os 140 dias de avaliação. No experimento 8 (Figura 4), verificou-se o surgimento e crescimento até os 105 dias, seguido de murcha e morte das estacas até os 140 dias de avaliação.

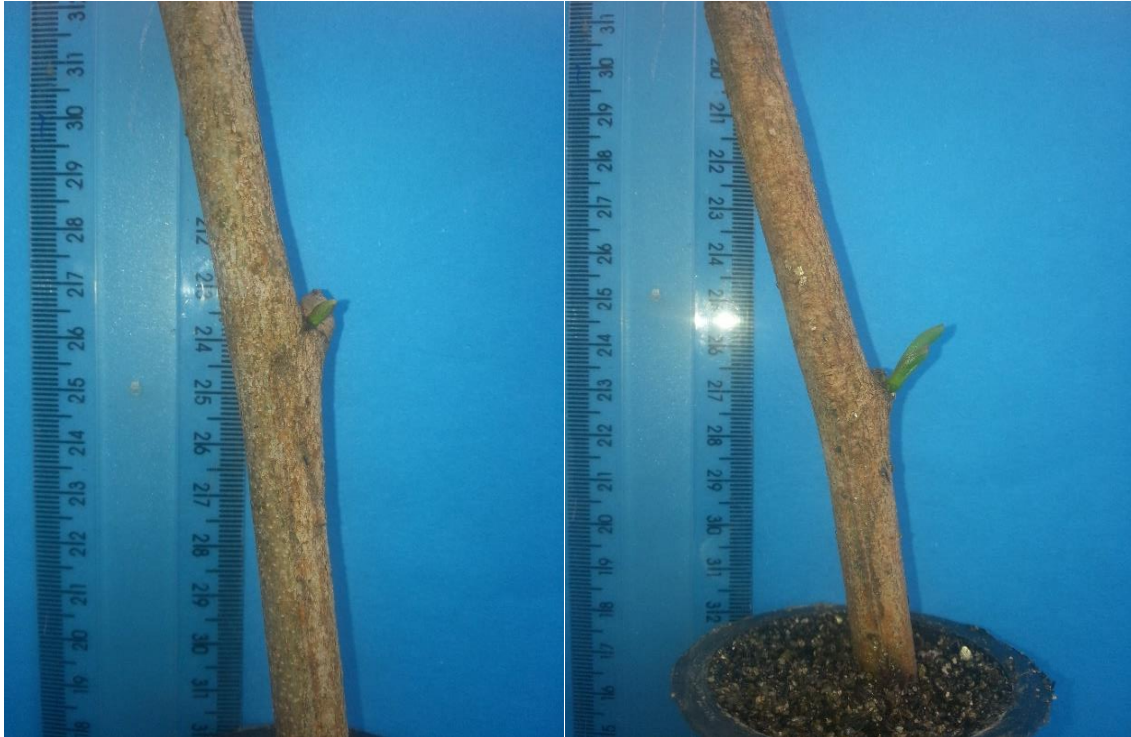
Possivelmente, a sobrevivência das estacas e o surgimento e crescimento de brotações foram devido às reservas nutritivas. A presença de carboidratos influencia no enraizamento, sendo fontes de energia e de carbono para sínteses de outras substâncias, que são essenciais para a emissão de brotos e formação de raízes, como ácidos nucleicos e proteínas (HARTMANN et al., 2002).



**Figura 3:** Percentual de brotações emitidas em estacas caulinares de *Xylopiá aromática*, em diferentes classes de diâmetro e concentrações de AIB, no período de junho a novembro de 2015.



**Figura 4:** Percentual de brotações emitidas em estacas caulinares de *Xylopiá aromática* em diferentes classes de diâmetro e concentrações de AIB, no período de novembro de 2015 a abril de 2016.



**Figura 5:** Brotações em estacas caulinares *Xylopia aromatica* aos 30 dias.

Aos 140 dias de permanência em casa de vegetação, verificou-se ausência de enraizamento e 100% de mortalidade das estacas nos experimentos 6 e 8, realizados em distintas épocas do ano, a qual foi precedida pela morte das brotações. Isso indica que o surgimento de brotações nas estacas provenientes de plantas adultas de *Xylopia aromatica* não garantiu a sobrevivência e o enraizamento.

Pacheco; Franco (2008), avaliando o enraizamento em estacas de *Luehea divaricata* Mart., com ausência e presença de folhas, sem nenhum regulador de crescimento, verificaram mortalidade em 100% das estacas sem folhas antes do enraizamento.

Em geral, espécies florestais nativas apresentam grande variações na capacidade de enraizamento de estacas provenientes de árvores adultas. Ao longo dos ramos pode existir diferença no conteúdo de carboidratos, aminoácidos e de outras substâncias, como auxinas, que servirão como reserva energética necessárias para que ocorram respostas morfogênicas nos propágulos (HARTMANN et al., 2011).

Estacas mais lignificadas apresentam maior dificuldade para enraizar, seja pela presença de um anel de esclerênquima contínuo, que pode constituir uma barreira física à emergência das raízes, ou pela menor habilidade fisiológica em formar primórdios radiculares (TOFANELLI, 1999).



Maior porção de tecidos esclerenquimáticos em estacas caulinares com maior diâmetro, apresenta relação negativa com a habilidade para o enraizamento e com a qualidade do sistema radicular (SANTOS et al., 2011).

O enraizamento das estacas também pode ter sido afetado pela baixa capacidade genética das árvores matrizes para a formação de raízes adventícias, pelo uso de propágulos com condições fisiológicas desfavoráveis ao enraizamento, ou ainda devido ao grau de maturidade da estaca.

O fator juvenilidade exerce grande influência na propagação vegetativa, pois a velocidade e facilidade de enraizamento dos propágulos decresce com a idade da planta matriz que os originou (HARTMANN et al., 2011). A maturidade de tecidos mais velhos, agregadas às características genéticas da planta (porção entre tecidos parenquimáticos e esclerenquimáticos) podem ser responsáveis pela não formação ou redução da indução de raízes (SANTOS et al., 2011).

Contudo, para *Xylopia aromatica* não existem relatos sobre o enraizamento de material adulto, sendo necessário a realização de estudos complementares, testando outros fatores como tipos de substratos, épocas de coleta e concentrações de AIB, possibilitando a comprovação da existência da relação inversa entre a capacidade de brotação e o enraizamento das estacas dessa espécie. Segundo Hartmann et al. (2002), estacas coletadas na primavera e no verão tendem a ter maior facilidade de enraizamento em função do crescimento vegetativo nessas estações climáticas do ano.

O fato de as estacas, aos 100 dias em casa de vegetação, apresentarem 100% de sobrevivência, implica que a aplicação de AIB e a posição de coleta de estaca no ramo não influenciaram a sobrevivência das mesmas, e que, durante esse período, pode ter ocorrido uma adequação do ambiente para a manutenção da sobrevivência dos propágulos vegetativos de *Xylopia aromatica*, o que não ocorreu para a rizogênese.

A utilização de um ambiente adequado e com nebulização aumentam as chances de sobrevivência das estacas (GRAÇA et al., 1988), uma vez que as condições ideais de umidade e de temperatura garantem o seu turgor hídrico, embora a sobrevivência na casa de vegetação não seja uma garantia para o posterior enraizamento (IRITANI; SOARES, 1983).

Em *Ocotea puberula* Benth Hook e *Ocotea pretiosa* Nees, não foram verificadas respostas rizogênicas nas estacas caulinares provindas de plantas adultas no inverno tratadas com 0, 2000 ou 4000 mg L<sup>-1</sup> de AIB (SILVA, 1984).

Estacas provindas de plantas adultas e de regeneração na primavera de *Luehea divaricata* Mart. apresentaram 26,5% de enraizamento no tratamento com 2000 mg L<sup>-1</sup> de AIB (NAZÁRIO et al., 2007).

Já em *Erythrina crista-galli* L. ocorreram altos índices de enraizamento das estacas caulinares apicais e laterais de rebrota em árvores adultas, variando de 60 a 100%, com a utilização de 2000 a 4000 mg L<sup>-1</sup> de AIB (CHAVES et al., 2003).

#### 4 CONCLUSÕES

- As concentrações de GA<sub>3</sub> não foram eficientes na germinação de sementes de *Xylopiã aromática*.
- As concentrações de AIB não foram eficientes na indução de raízes em estacas caulinares e radiculares de *Xylopiã aromática*.
- Os resultados de sobrevivência e enraizamento das estacas, aos 140 dias de avaliação, demonstram que os procedimentos adotados no presente estudo não foram eficientes tecnicamente para a propagação vegetativa da *Xylopiã aromática* por estaquia.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO NETO, J. C.; AGUIAR, I. B.; FERREIRA, V. M. Effect of temperature and light on *Acacia polyphylla* DC. Seed germination. **Revista Brasileira de Botânica** v.26, p. 249-256, 2003.

ASEKUN, O.T.; KUNLE, O. The Chemical Constituents of the fruit essential oil of *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich from Nigeria, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.7, p.186-189, 2004.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994.

BIASI, L.A. Reguladores de crescimento vegetal. In: WACHOWICZ, C.M.; CARVALHO, R.I.N. **Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita**. Curitiba: Champagnat, 2002. 424p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000.

CASTELLANI, E.D.; DAMIÃO-FILHO, C.F.; AGUIAR, I.B. Caracterização morfológica de frutos e sementes de espécies arbóreas do gênero *Xylopi a* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.205-211, 2001.

CHAVES, C. R. M. et al. Enraizamento de cinco tipos de estacas caulinares de corticeira-dobanhado. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 15. p. 135, 2003. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 9., 2003, Atibaia. **Anais...** Atibaia: [s. n.], 2003.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of Seed Science and technology**. New Jersey: Chapman & Hall, 1995. 409p.

COSTA, R.B. **Avaliação do sistema reprodutivo de *Anadenanthera falcata* Benth., *Vochysia tucanorum* Mart. e *Xylopi a aromatica* Baill. em área de Cerrado no município de Itirapina- Estado de São Paulo**. 1988. Dissertação, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba 1988.

DIAS, M.C. **Estudos taxonômicos do gênero *Xylopi a* L. (Annonaceae) no Brasil extra-amazônico**. 1998 196f. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

EHLERT, P.A.D. et al. Propagação vegetativa da alfavacacravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.10-13, 2004.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: Editora e Gráfica UFPEL, 1995. 125p.

FERREIRA, M.G.R.; SILVA, E.O; GONÇALVES, E.P; ALVES, E.U; BRUNO, R.L.A; RIBEIRO, G.D. Superação de dormência em sementes de biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill). (**Circular técnica n, 94**) Porto Velho, RO. Embrapa junho de 2007.

FOURNIER, G.; HADJAKHOONDI, A.; CHARLES, B.; FOURNIAT, J., LEBOEUF, M.; CAVE, A. Chemical and biological studies of *Xylopiya aromatica* stem bark and leaf oils. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 60, n.3, p.283-284, 1994.

FOWLER, A. J. P.; BIANCHETTI, A. *Dormência em sementes florestais*. Colombo: Embrapa Florestas, (**Documentos, 40**), 2000.

GRAÇA, M. E. C. et al. Estaquia de erva-mate. Curitiba: Embrapa-CNPQ, (**Circular Técnica**, n. 18), 6 p. 1988. HAIG, D.; WESTOBY, M. Seed size, pollination costs and angiosperm success. **Evolutionary Ecology**. v.5, n. 231-247, 1991.

HARTMANN, H. T; KESTER, D. E; DAVIES JR, F. T; GENEVE, R. L. Hartmann and Kester's **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall. 2011. 915 p.

IRITANI, C.; SOARES, R. V. Ação de reguladores de crescimento em estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Floresta**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 59-67, 1981.

KHAN, M.L.; SHANKAR, U. Effect of seed weight, light and substratum microsite on germination and seedling growth of *Quecus semiserrata* Roxb. **Tropical Ecology**, v.42, p. 117-125, 2001.

LANDENBERGER, R. E.; OSTERGREN, D. A. *Eupatorium rugosum* (Asteraceae) flowering as an indicator of edge effect from clearcutting in mixedmesophytic **Forest Ecology and Management**. v.155, p.55–68, 2002.

LOBO, M.; DELGADO, O.; CARTAGENA, J.R.; FERNÁNDEZ, E. Categorization of germination and dormancy of cherimoya (*Annona cherimola* L.) and soursop (*Annona muricata*

L.) seeds as a support for germplasm conservation programs. **Agronomía Colombiana** v.25, p.231-244, 2007.

MELO, J. T., SILVA, J. A., TORRES, R. A. A., SILVEIRA, C. E. S. & CALDAS, L. S. **Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do Cerrado**. In: SANO, S. M. & ALMEIDA, S. P. (eds). **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina. p. 195-243., 1998.

NAZÁRIO, P.; WENDLING, I.; SOUSA, L. P. Enraizamento de estacas de *Luehea divaricata* sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Pesquisa Florestal brasileira**, Colombo, n. 54, p. 139-143, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. A study of the origin of central brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinb. Jornal of Botany*, v. 52, n, 2, p. 141-194. 1995.

PACHECO, J.P.; FRANCO, E.T.H. Substratos e estacas com e sem folhas no enraizamento de *Luehea divaricata* Mart. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1900-1906, out, 2008.

SÃO PAULO (ESTADO). SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Resolução SMA n.47, de 26 de novembro de 2003. *Diário Oficial*, São Paulo, 27 de novembro de 2003.

SAUTU, A.; BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C.; DEAGO, J.; CONDIT, R. Classification and ecological relationships of seed dormancy in a seasonal, moist tropical forest, Panama, Central America. **Seed Science Research**, v.17, n.2, p.127-140, 2007.

SANTOS, S.R.G.; AGUIAR, I.B. 2000. Seed germination of *Sebastiania commersonia* (Bill.) Smith & Down affected by substrate and temperature regime. **Revista Brasileira de Sementes** v.22, p. 120-126, 2000.

SILVA, I. C. **Propagação vegetativa de *Ocotea puberula* Benth Hook e *Ocotea pretiosa* Nees pelo método de estaquia**. 1984. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1984.

SILVA, J. B.; SALATINO, A; PANIZZA, S. Ensaios fitoquímicos preliminares em espécies do Cerrado. **Acta Botânica**. 4, p.129-132. 1976.

SCHAAL, B.A. Reproductive capacity and seed size in *Lupinus texensis*. **American Journal of Botany** v.67, p.703-709, 1980.

SOCOLOWSKI, F.; CICERO, S. M. Use of growth regulators to overcome seed dormancy in *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Seed Science and Technology**, v.39, n.1, p.21-28, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 784p.

TAKAHASHI, J.A; PEREIRA, C.R; BOAVENTURA, M.A; SILVA, L.G.F. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Natural Product Reserach**. v. 20, 2006.

THOMAS, S. G.; RIEU, I; STEBER, C. M. Gibberellin metabolism and signaling. **Vitamins and Hormones**, v.72, p.289-338, 2005.

TOFANELLI, M. B. D. **Enraizamento de estacas lenhosas e semilenhosas de cultivares de pessegueiro em diferentes concentrações de ácido indolbutírico**. 1999. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

VARANDA, E. M.; COSTA, A. A.; BAROSELA, J. R. Leaf development in *Xylopia aromatica* (Lam) Mart. (Annonaceae): Implications for palatability to *Stenoma scitirolla* Walkre 1864 (Lepidoptera: Elasmobranchidae). **Brasilian Journal of Biologiy**, v. 68:4, p.831-836, 2008.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. Colombo: (**Documentos, 130**). Embrapa Florestas. 2006. 54 p.

## CAPITULO 2: Micropropagação de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.

**Resumo** - O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação para *Xylopia aromatica*, visando à produção de mudas, avaliando as condições de cultivo *in vitro*, como meio de cultura, concentração de sacarose e reguladores de crescimento mais adequados para a espécie, nas fases de multiplicação, alongamento e enraizamento. Foram utilizados explantes provindos de brotações de mudas produzidas via seminal e mantidas em viveiro. Em condição de laboratório, em câmara de fluxo laminar, realizou-se a desinfestação das brotações e a introdução *in vitro* em meio de cultura MS. A partir da introdução da espécie *in vitro*, iniciou-se sucessivas multiplicações em meio MS com 100% dos sais e vitaminas, suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar MERCK®, 0,5 de BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA para formação de um banco de propágulos. No primeiro experimento, foram testados os meios de cultura MS e WPM e concentrações de 0,5 e 0,8 mg L<sup>-1</sup> de BAP para a multiplicação *in vitro*. Foi avaliado o número de brotações emitidas e percentual de calos a cada trinta dias. No segundo experimento, foi avaliado a multiplicação *in vitro* em meio MS com concentrações de 0; 15; 30 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, avaliando o número de brotações e percentual de calos emitidas a cada 30 dias. No terceiro experimento foram testadas combinações entre BAP (0,01 e 0,05 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e GA<sub>3</sub> nas concentrações (1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) adicionados ao meio de cultura na fase de alongamento. Aos 70 dias, foram avaliadas a altura das brotações (cm), o comprimento da maior folha (cm) e a contagem do número de folhas. No quarto experimento foi testado concentrações de GA<sub>3</sub> (2,5; 5,0, 7,5 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>) adicionadas ao meio de cultura. Aos 40 dias, foram avaliadas a altura das brotações (cm), o comprimento da maior folha (cm), e a contagem do número de folhas. No quinto experimento, foi testado AIB para indução de raízes nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Aos 40 dias, foi avaliado o número de raízes. O sexto experimento foi semelhante ao quinto, com exceção do AIB que foi substituído pelo ANA. Para todos os experimentos, adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), quatro repetições e 6 tubos com um explante por repetição. As maiores taxas de multiplicação foram obtidas com o meio MS acrescido de 0,8 mg L<sup>-1</sup> de BAP e sacarose a partir de 30 g L<sup>-1</sup>. O alongamento da espécie foi possível com o uso de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Não foi verificado na fase de enraizamento a formação de raízes.

Palavras-chave: Regulador de crescimento; sacarose; meio de cultura.



## ABSTRACT

The objective of this study was to develop a micropropagation protocol for *Xylopia aromatica*, aiming at the production of seedlings, evaluating the *in vitro* culture conditions such as culture medium, sucrose concentration and regulators more suitable growth for the species, in phases multiplication, elongation and rooting. Explants were used stemmed sprouts seedlings produced seminal saw and maintained nursery. In laboratory conditions, in a laminar flow chamber, held the disinfestation of the shoots and the introduction *in vitro* in MS medium. Since the introduction of *in vitro* species began successive multiplications in MS medium with 100% of the salts and vitamins supplemented with 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol 800 mg L<sup>-1</sup> of PVP, 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 6 g L<sup>-1</sup> agar Merck®, 0,5 BAP and 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA for forming a propagule bank. In the first experiment, the culture media MS and WPM and concentrations of 0,5 and 0,8 mg L<sup>-1</sup> BAP for *in vitro* multiplication were tested. It evaluated the number of issued shoots and percentage of calluses on every thirty days. In the second experiment, in the multiplication was evaluated *in vitro* on MS medium with concentrations of 0; 15; 30 and 60 g L<sup>-1</sup> sucrose by assessing the number of shoots and percentage of calluses issued to every 30 days. In the third experiment combinations were tested between BAP (0,01 and 0,05 mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0,5 and 1,0 mg L<sup>-1</sup>) and GA<sub>3</sub> concentrations (1,0 and 5,0 mg L<sup>-1</sup>) added to the culture medium in elongation phase. After 70 days were evaluated Shoot height (cm), the length of the longest sheet (cm) and the sheet number count. In the fourth experiment was tested concentrations of GA<sub>3</sub> (2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg L<sup>-1</sup>) added to the culture medium. At 40 days, they were evaluated the height of shoots (cm), the length of the longest leaf (cm), and number of leaves counting. In the fifth experiment, AIB was tested for induction of roots in concentrations of 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>. At 40 days, it evaluated the number of roots. The sixth experiment was similar to the fifth, with the exception of AIB was replaced polo ANA. For all experiments, we adopted a completely randomized design, four replications and 6 tubes with explants by repetition. The highest multiplication rates obtained with MS medium plus 0,8 mg L<sup>-1</sup> BAP and sucrose from 30 g L<sup>-1</sup>. The elongation of the species was made possible with the use of 5,0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. It was found in the rooting phase the formation of roots.

**Keywords:** Growth Regulator; sucrose; culture medium.

## 1 INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa *in vitro*, conhecida amplamente como micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é uma das aplicações mais práticas da cultura de tecidos. Historicamente, a primeira aplicação comercial foi feita por MOREL em 1946, multiplicando ápices caulinares de orquídeas e regeneração de protocormos. No ramo comercial, sua utilização é comum em diversos países, destacando a Europa Ocidental e os Estados Unidos. O uso comercial surgiu atrelado aos viveiros, como iniciativa de empresas produtoras de mudas, visando obter um material vegetal livre de doenças ou acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As aplicações da micropropagação para espécies nativas destinam-se, principalmente, para genótipos de difícil multiplicação (PELEGRINI et al., 2011), para conservação de germoplasma *in vitro* de espécies em extinção (MALOSSO et al., 2012), desenvolvimento e/ou aprimoramento de técnicas de biotecnologia (XAVIER et al., 2013).

Os meios nutritivos são utilizados amplamente na cultura de células, órgãos e tecidos vegetais, atuando como fonte de nutrientes e substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento. Geralmente, sua formulação baseia-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Por vários anos, o meio de cultura White (1951) foi usado como base para a cultura de tecidos para várias espécies. Posteriormente, através de aumento de concentrações de sais e redução da concentração de sódio e acréscimo de nitrogênio, surgiu como alternativa para otimizar o crescimento de calos *in vitro* (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio MS de Murashige & Skoog (1962), foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio White com extratos de folhas de fumo (CALDAS et al., 1998).

Por existir uma ampla variedade de meios de cultura, usualmente alguns são adaptados para várias espécies, diferindo apenas quanto à constituição e concentração dos nutrientes (AMARAL, 2006). O meio de cultura MS é um dos mais utilizados para a propagação de espécies nativas (BASSAN et al., 2006), demonstrado bons resultados para diversas espécies. Em contrapartida, o meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) foi desenvolvido especialmente para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, sendo muito utilizado para espécies florestais (OLIVEIRA et al., 2013).

Vários elementos, quando adicionados ao meio de cultura, podem influenciar o desenvolvimento *in vitro* da cultura, tanto na fase de multiplicação ou nas demais fases da

micropropagação da planta (GEORGE et al., 2008). Cada fase da micropropagação necessita de um controle na proporção dos reguladores de crescimento, sendo utilizados com maior frequência um balanço entre auxina e citocinina (DAVIDE; MELO, 2012).

O período inicial em que se estabelecem as melhores combinações e quais tipos de reguladores de crescimento que proporcionem o maior e melhor desenvolvimento para os explantes de espécies lenhosas, é um dos principais desafios da micropropagação. Dependendo do objetivo, deve-se levar em questão o tempo e os subcultivos necessários durante cada fase, até o objetivo final (XAVIER; OTONI, 2009).

Como a *Xylopia aromatica* apresenta limitações em sua propagação seminal, a micropropagação é uma alternativa para tentar superar esse entrave.

O cultivo *in vitro* representa uma alternativa viável para a propagação de várias espécies, possibilitando uma rápida propagação, com uniformidade e alto grau de sanidade. Além de contornar problemas relacionados aos métodos de propagação por sementes. Contudo, a micropropagação de anonáceas tem apresentado alguns obstáculos, como a dificuldade para obtenção de brotações, taxa de multiplicação, abscisão foliar, enraizamento e aclimatação (OLIVEIRA, 2016).

Considerando-se que não existem relatos de pesquisas relacionadas à micropropagação de *Xylopia aromatica*, este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação, visando à produção de mudas, avaliando as condições de cultivo *in vitro*, como meio de cultura, concentração de sacarose e reguladores de crescimento mais adequados para a espécie, nas fases de multiplicação, alongamento e enraizamento.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no período de agosto de 2015 a maio de 2016 no Laboratório de Melhoramento Florestal do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, em Diamantina, Minas Gerais.

### **2.1 Material vegetal**

Foram utilizadas mudas de *Xylopia aromatica* produzidas via seminal e mantidas em viveiro. Estas foram mantidas em condições de casa de vegetação, com irrigação somente no substrato, até a emissão de novas brotações. As brotações emitidas contendo gemas axilares foram coletadas e tiveram as folhas retiradas. Em condição de laboratório, em câmara de fluxo

laminar, realizou-se o processo de desinfestação, sendo inicialmente lavadas em água deionizada e autoclavada, seguido de imersão em álcool 70% durante 30 segundos. Logo após, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) adicionado de 4 a 5 gotas de detergente comercial Tween20 por 100 ml de solução durante 20 minutos e enxaguadas com água deionizada e autoclavada por quatro vezes. Posteriormente, fez-se a inoculação em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 50% dos sais e vitaminas e transferência para a sala de cultura, sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Foram introduzidos vinte explantes, dos quais apenas quatro não sofreram nenhuma contaminação e permaneceram com vigor. A partir desses quatro explantes, iniciou-se a multiplicação *in vitro*. Utilizou-se o meio de cultura MS com 100% das concentrações de sais minerais e vitaminas, suplementado com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de PVP,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar MERCK®,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de Benzilaminopurina (BAP) e  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido naftalenoacético (ANA).

Foram realizados sucessivos subcultivos *in vitro*, em média a cada 30 dias, visando à multiplicação e formação de um banco de propágulos. Tal procedimento iniciou-se no segundo semestre de 2014 e os subcultivos foram realizados até junho de 2015, quando foram instalados os experimentos descritos nesse capítulo.

## **2.2 Micropropagação de *Xylopia aromatica***

### **2.2.1 Experimento 1 – Multiplicação *in vitro* de *Xylopia aromatica* sob diferentes meios de cultura e concentrações de BAP**

Os explantes utilizados foram gemas axilares oriundas do banco de propágulos estabelecido conforme o (item 2.1). Utilizou-se os meios de cultura MS e WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), descritos na Tabela 1, com 100% das concentrações de sais minerais e vitaminas, suplementado com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de PVP,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar MERCK®. Foram utilizadas as concentrações de  $0,5$  e  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  ANA.

**Tabela 1:** Composição do meio de cultura MS e WPM utilizados na micropropagação de *Xylopia aromatica*

Composto	Fórmula Química	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	
		MS	WPM
<b>Macronutrientes</b>			
Nitrato de Amônia	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650,00	400
Nitrato de Potássio	KNO <sub>3</sub>	1.900,00	-
Cloreto de Cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	400	96
Sulfato de Potássio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	990
Nitrato de Cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	556
Fosfato de Potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370
<b>Micronutrientes</b>			
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
Molibdato de Sódio	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
Cloreto de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	-
Sulfato de Manganês	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	22,3
Sulfato de Zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,25
Iodeto de Potássio	KI	0,83	-
<b>FeEDTA</b>			
Sódio EDTA	Na <sub>2</sub> E.D.T.A.	37,2	37,2
Sulfato de Ferro	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	27,8	27,8
<b>Vitaminas</b>			
Ácido Nicotínico	-	0,5	0,5
Piridoxina.HCL	-	0,1	0,5
Tiamina.HCL	-	0,1	1
Glicina	-	2	2

O meio de cultura teve o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,02$ , antes da inclusão do ágar, e foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm e resfriado antes da inoculação do material vegetal.

Após inoculação em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 ml de meio de

cultura e vedados com tampas plásticas, os explantes foram transferidos para a sala de cultura com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos (MS + 0,5 BAP; MS + 0,8 BAP; WPM + 0,5 BAP e WPM + 0,8 BAP  $\text{mg L}^{-1}$ ), com 4 repetições e 6 tubos com um explante por repetição. Este experimento foi constituído pelo cultivo inicial e dois cultivos subsequentes (cultivo inicial, subcultivos 1 e 2). Durante os subcultivos, respeitou-se o histórico do explante, ou seja, a repicagem de cada explante foi realizada para o tratamento semelhante ao do seu subcultivos anterior.

Aos 30 dias de cada subcultivo, fez-se a avaliação do número de brotações emitidas por explante e de calos, por meio de uma escala visual de avaliação em relação a área de ocupação do mesmo dentro do tubo de ensaio (0%: ausente; 25%: baixo; 50%: médio; 75-100%: alto).

### **2.2.2 Experimento 2 – Multiplicação *in vitro* de *Xylopiá aromática* sob diferentes concentrações de sacarose**

Utilizou-se o meio de cultura MS (Tabela 1), com 100% das concentrações de sais minerais e vitaminas, suplementado com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de PVP, concentrações variadas de sacarose conforme tratamentos (0, 15, 30 e  $60 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar MERCK®. Foi adicionado  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  ANA.

O meio de cultura teve o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,02$ , antes da inclusão do ágar, e foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de  $121^\circ\text{C}$  e pressão de 1 atm e resfriado antes da inoculação do material vegetal.

Gemas axilares, oriundas do banco de propágulos estabelecido conforme o item 2.1, foram inoculadas em tubos de ensaio de  $25 \times 150 \text{ mm}$ , contendo 10 ml de meio de cultura e vedados com tampas plásticas. Os tubos com os explantes foram transferidos para sala de cultura com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos (0, 15, 30 e  $60 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose), com 4 repetições e 6 tubos com um explante por repetição. Este experimento foi constituído pelo cultivo inicial e um subcultivo. Respeitou-se o histórico do explante, ou seja, a repicagem de cada explante foi realizada para o tratamento semelhante ao do seu subcultivos anterior.

Aos 30 dias de cada subcultivo, fez-se a avaliação do número de brotações emitidas por explante e de calos, por meio de uma escala visual de avaliação em relação a área de ocupação dentro do tubo de ensaio (0%: ausente; 25%: baixo; 50%: médio; 75-100%: alto).

### **2.2.3 Experimento 3 – Alongamento com o uso de BAP, ANA e GA<sub>3</sub>**

Foram utilizados segmentos (brotações) com tamanho aproximado de 1cm e com dois pares de folhas, obtidos de subcultivos da fase de multiplicação, realizada no meio MS contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA, suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar MERCK®.

O meio de cultura utilizado para o alongamento foi semelhante ao descrito no parágrafo anterior, porém com modificações nas concentrações dos reguladores de crescimento, as quais constituíram os tratamentos. Foram utilizadas concentrações de 0,01 e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, combinadas com 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA (compondo quatro tratamentos) e mais dois tratamentos com as concentrações de 1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8 ± 0,02, antes da inclusão do ágar, e foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm e resfriado antes da inoculação do material vegetal.

Após inoculação em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 ml de meio de cultura e vedados com tampas plásticas, os explantes foram transferidos para a sala de cultura com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 6 tratamentos, 4 repetições e 6 tubos com um segmento por repetição. Constituíram os tratamentos as concentrações de 0,01 BAP + 0,5 ANA; 0,01 BAP + 1,0 ANA; 0,05 BAP + 0,5 ANA; 0,05 BAP + 1,0 ANA; 1,0 GA<sub>3</sub> e 5,0 GA<sub>3</sub>.

Aos 70 dias, foram avaliadas a altura das brotações (cm) e o comprimento da maior folha (cm), com o auxílio de régua milimetrada posicionada do lado externo do tubo de ensaio, e a contagem do número de folhas.

### **2.2.4 Experimento 4 – Alongamento com o uso de GA<sub>3</sub>**

A fonte de explantes utilizada, o preparo do meio de cultura e as condições de incubação foram semelhantes ao descrito no experimento 3 (item 2.2.3), com modificações em relação aos

tratamentos com reguladores de crescimento, sendo avaliadas quatro concentrações de GA<sub>3</sub> (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>).

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos (concentrações de GA<sub>3</sub>), 4 repetições e 6 tubos com um segmento por repetição.

Aos 40 dias, foram avaliadas a altura das brotações (cm) e o comprimento da maior folha (cm), com o auxílio de régua milimetrada posicionada do lado externo do tubo de ensaio, e a contagem do número de folhas.

### **2.2.5 Experimento 5 – Enraizamento com o uso de AIB**

Foram utilizados explantes com tamanho aproximado de 1,5 cm, contendo um par de folhas, obtidos da fase de alongamento provenientes do alongamento com tratamento de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> do experimento 4 (item 2.2.4).

Os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar MERCK®. Constituíram os tratamentos as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido-indolbutírico (AIB), que foram adicionadas ao meio de cultura.

O meio de cultura teve o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,02$ , antes da inclusão do ágar, e foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm e resfriado antes da inoculação do material vegetal.

Após inoculação em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 ml de meio de cultura e vedados com tampas plásticas, os explantes foram transferidos para a sala de cultura com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos, 4 repetições e 6 tubos com um segmento por repetição. Aos 40 dias, foi avaliado o número de raízes.

### **2.2.6 Experimento 6 – Enraizamento com o uso de ANA**

A fonte de explantes utilizada, o preparo do meio de cultura básico e as condições de incubação foram semelhantes ao descrito no experimento 5 (item 2.2.5.), com exceção da adição do AIB. Para este experimento, constituíram os tratamentos as concentrações de 0,5;



1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA), que foram adicionadas ao meio de cultura.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos, 4 repetições e 6 tubos com um segmento por repetição. Aos 40 dias, foi avaliado o número de raízes.

### 2.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, testes de média ou análise de regressão quando necessário com o auxílio do software R versão 3.0.1 (R CORE TEAM, 2013) utilizando os pacotes ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2013) e Stats (R CORE TEAM, 2013).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Experimento 1 – Multiplicação *in vitro* de *Xylopiia aromatica* sob diferentes meios de cultura e concentrações de BAP

Foram encontradas diferenças significativas em relação ao número de brotações emitidas, entre os tratamentos em todos os subcultivos realizados (Tabela 2).

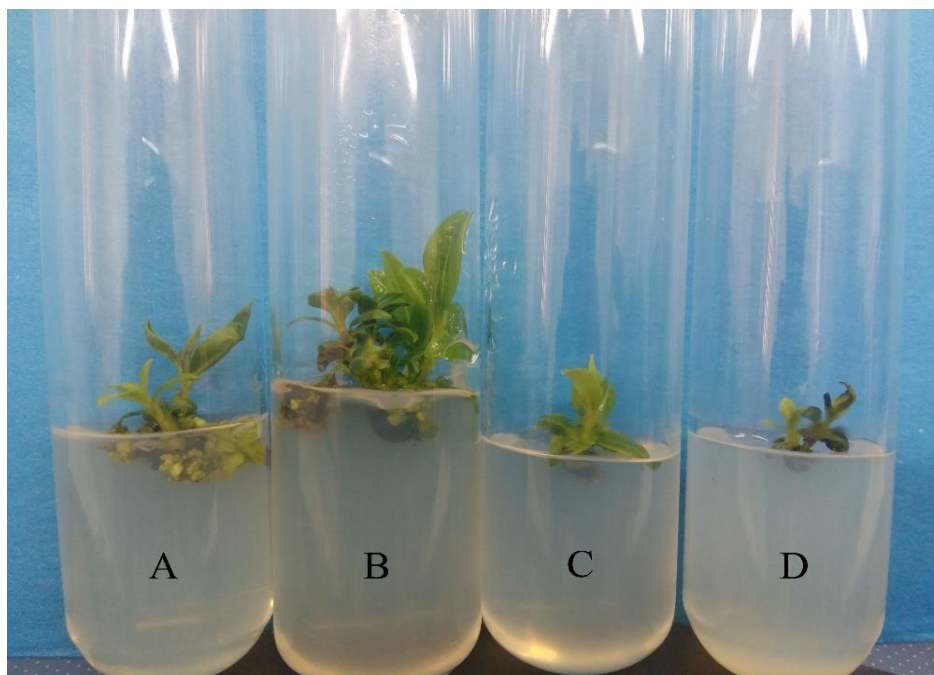
**Tabela 2:** Resultado da análise de variância para o número de brotações emitidas em explantes de *Xylopiia aromatica*, em função dos meios de cultura e concentrações de BAP, nos três subcultivos

FV	GL	Quadrados médios		
		Cultivo inicial	Subcultivo 1	Subcultivo 2
Tratamento	3	4,4523*	8,8585*	6,1569*
Resíduo	12	0,2194	0,3284	0,1566
CV (%)		19,38	18,72	15,07

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação; \* Diferença significativa a 5% de significância.

Para o cultivo inicial e nos subcultivos subsequentes, o meio MS apresentou melhor desempenho para emissão de brotações quando comparado com o meio WPM. As respostas de emissão de brotações em explantes cultivados em meio MS acrescido de BAP foram

considerados satisfatórios, pois possibilitaram o incremento em altura e em número de brotações, originando novos explantes durante a fase de multiplicação (Figura 1).

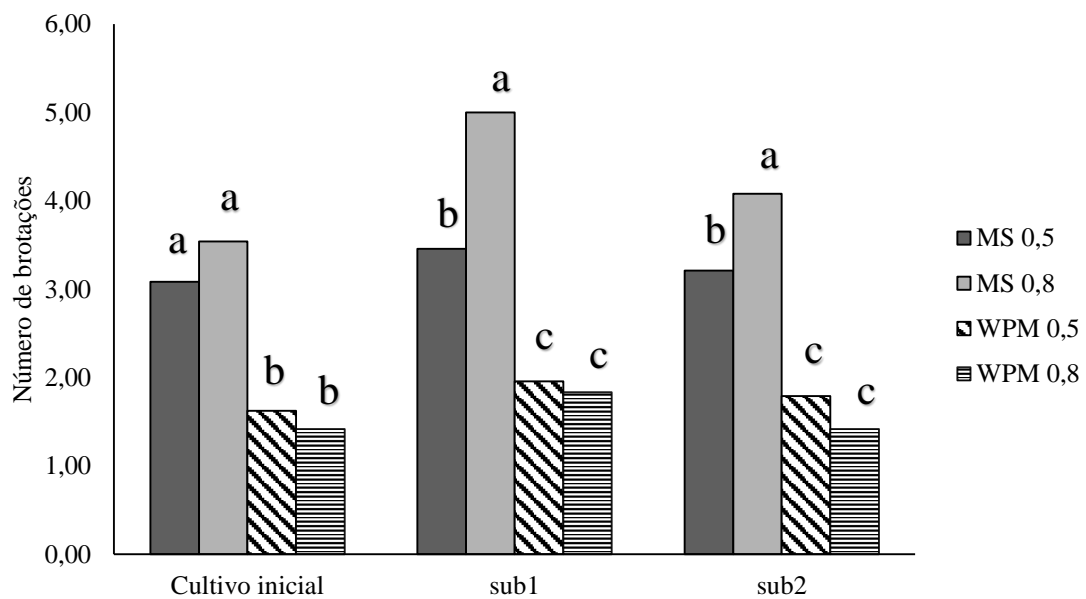


**Figura 1:** Multiplicação de explantes de *Xylopiya aromatica* com 30 dias, em meio de cultura. A) MS + 0,5 BAP, B) MS + 0,8 BAP, C) WPM + 0,5 BAP e D) WPM 0,8 BAP.

Não foi verificado efeito fitotóxico do BAP, provavelmente devido as concentrações utilizadas estarem dentro da zona de máximo incremento para o desenvolvimento dos explantes de *Xylopiya aromatica*, tomando por base resultados de experimentos realizados e não apresentados. Também não foi observado oxidação dos explantes durante a fase de multiplicação.

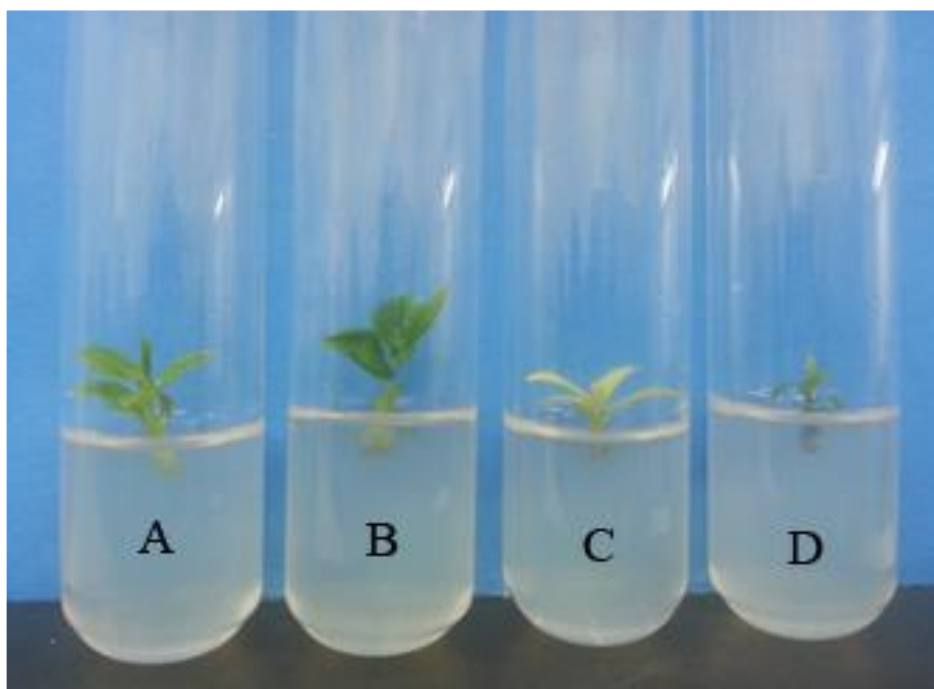
Observa-se que a tendência para o número de brotações emitidas, em todos os tratamentos, teve um aumento do cultivo inicial para o subcultivo 1, seguido de decréscimo do subcultivo 1 para o 2 (Figura 2).

No cultivo inicial os tratamentos MS + 0,5 BAP e MS + 0,8 BAP não se diferenciaram estatisticamente, porem nos demais subcultivos, o tratamento MS + 0,8 BAP mostrou-se superior em relação a todos.



**Figura 2:** Número de brotações emitidas em resposta aos meios de cultura e concentrações de BAP, no cultivo inicial e nos subcultivos 1 e 2 (sub1 e sub2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de significância dentro de um mesmo subcultivo.

Nos tratamentos que continham o meio MS, no geral, os explantes apresentaram folhas verde, vigorosas e brilhantes durante toda fase experimental. Porém, nos tratamentos utilizando o meio WPM, no subcultivo 2, os explantes perderam o vigor, apresentando folhas com coloração amarelada e redução do tamanho (Figura 3).



**Figura 3:** Multiplicação de explantes de *Xylopia aromatica* no subcultivo 2. A) MS + 0,5 BAP, B) MS + 0,8 BAP, C) WPM + 0,5 BAP e D) WPM + 0,8 BAP.

Os meios de cultura consistem de uma mistura balanceada de macro e micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento (QUISEN; ANGELO, 2008). O meio é responsável pelo fornecimento dos nutrientes necessários para o crescimento da cultura, sendo que o sucesso da micropropagação da planta é fortemente influenciado pela natureza do meio de cultura utilizado (GEORGE et al., 2008).

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não existe uma formulação padrão, contudo, o meio MS, com suas modificações e diluições, tem apresentado maior sucesso em diversas espécies lenhosas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O meio MS tem se mostrado superior em relação a outros meios nutritivos devido a quantidade de nitrogênio presente, sendo a concentração deste elemento maior no meio em questão (RODRIGUES et al., 2012).

No presente estudo, verificou-se que o meio MS foi superior em todas as avaliações quando comparado com o meio WPM, podendo indicar que o balanço nutricional do meio WPM não é o mais indicado para o cultivo *in vitro* de *Xylopia aromatica*.

Naves (2001) verificou em *Alcantarea imperialis*, aumento na quantidade de brotos com a concentração de 100% do meio MS. Chaves et al. (2005), encontraram diferenças significativas usando meio MS 100%, acrescido de 0,3 mg L<sup>-1</sup> de BAP para *Physalis peruviana*, com uma média de 1,75 brotações por explante. Villa et al. (2005) utilizando meio MS 150% acrescido de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>) encontraram 3,99 brotos por explante em *Rubus fruticosus*.

Miranda (2015), testando os meios MS 50%, MS 100%, WPM 50% e WPM 100% (com adição de 0,6 mg L<sup>-1</sup> BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA), verificou que o meio MS 100% promoveu o maior número de brotações em explantes de *Eremanthus incanus*.

Entre os fatores que controlam a morfogênese *in vitro* de anonáceas, pode-se destacar os reguladores de crescimento, especialmente o balanço entre auxina e citocinina. O BAP tem sido a citocinina mais utilizada para induzir brotações em diversas espécies de anonáceas (RASAI et al., 1995).

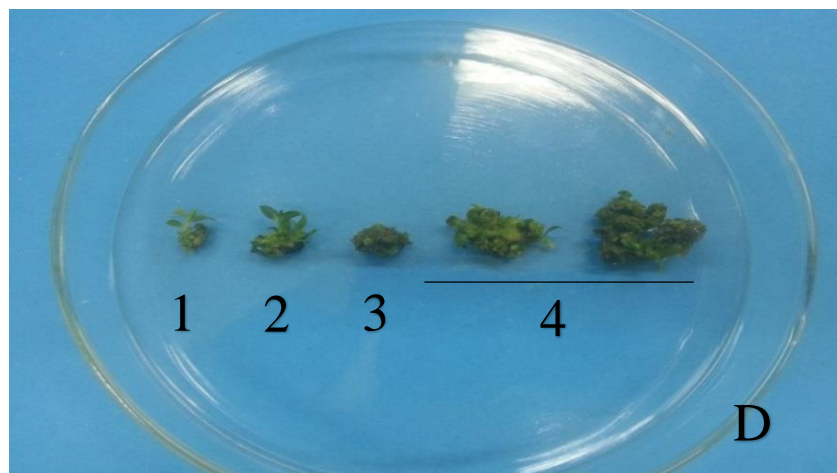
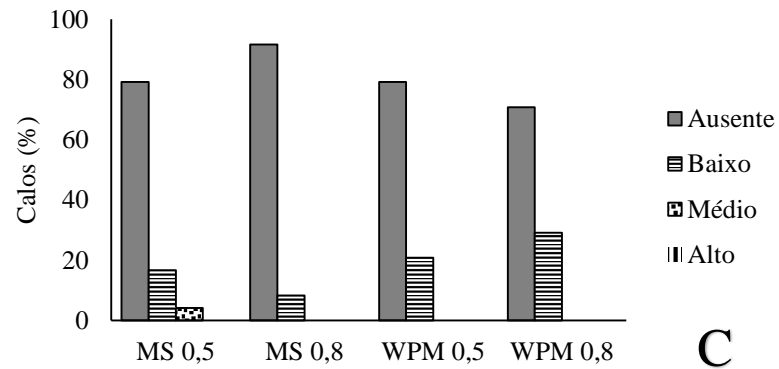
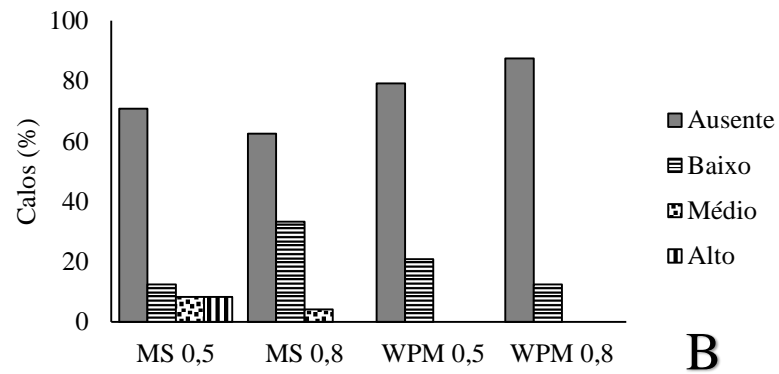
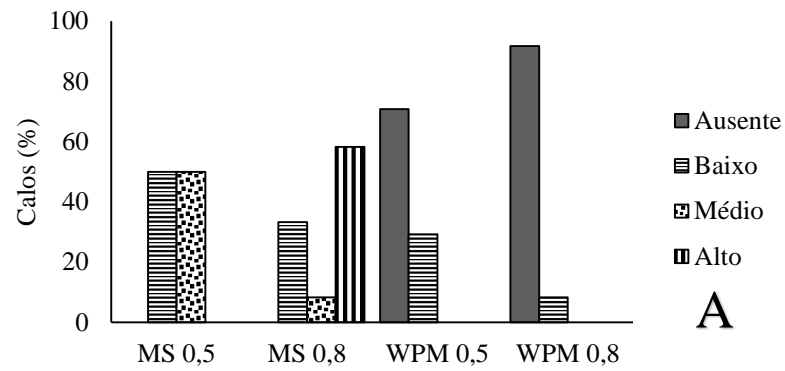
Em diversos estudos de multiplicação de espécies lenhosas, a quantidade de brotos aumentou à medida em que se elevaram as concentrações de BAP (ANDRADE et al., 2000; SOUZA et al., 2003; KIELSE et al., 2009). As citocininas estimulam a formação e o crescimento da parte aérea até uma determinada concentração, que varia de acordo com as exigências de cada espécie. Acima de determinada concentração, pode ser prejudicial, com efeito fitotóxico no desenvolvimento morfogênico dos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Nobre et al. (1998) observaram resultados satisfatórios na fase de multiplicação de *Ficus carica*, 5,3 brotos por explante utilizando 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Nagori; Purohit (2004) demonstraram que a adição de citocininas no meio de cultura é essencial para indução de brotos adventícios em segmentos de hipocótilos de *Annona squamosa* e que um maior número de brotações poderia ser obtido com a utilização de BAP em concentrações de 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

Skirvin et al., (1981), obteve uma rápida proliferação de gemas axilares de *Rubus fruticosus*, utilizando meio MS acrescido de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Com relação a formação de calos, avaliado por meio da área de ocupação do calo em relação ao meio de cultura (Figura 4D), foi observado no cultivo inicial (Figura 4A), alto a médio percentual de calos para os tratamentos MS 0,5 e 0,8; nos demais foi ausente e baixo percentual. No subcultivo 1 (Figura 4B), houve queda no percentual de calos nos tratamentos MS 0,5 e 0,8 nas classes alto e médio e no tratamento WPM 0,5, houve queda na classe baixo, sendo assim observado que maior quantidade de explantes apresentavam ausência de calos. No subcultivo 2 (Figura 4C), em geral observou-se ausência de calos ou baixo calejamento, o que é mais desejável para o estabelecimento da multiplicação *in vitro*.



**Figura 4:** Percentual de calos observados em explantes de *Xylopia aromatica*, nas quatro classes (Ausente; Baixo; Médio e Alto) em resposta aos meios de cultura e concentrações de BAP no cultivo inicial (A), subcultivo 1 (B), subcultivo 2 (C) e quantificação de calos (D). 1) Ausente 2) Baixo, 3) Médio e 4) Alto.

A porcentagem de calos foi superior nos tratamentos que continha o meio MS quando comparado com o meio WPM, porém a quantidade de calos foi diminuindo gradativamente após cada subcultivo, No entanto, a formação de calos não comprometeu a formação de brotos.

Heberle (2010) observou a ocorrência de calo na base dos explantes de *Cordia trichotoma*, em todas as concentrações de BAP utilizadas em seu trabalho 0; 0,25; 0,50 e 0,75 mg L<sup>-1</sup>, não comprometendo a formação de brotos.

Concentrações mais altas de citocinina podem promover a formação de calos, o que não é objetivo na fase de multiplicação, pois a formação de calos na base do explante pode comprometer a proliferação de gemas axilares (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A formação de calos resulta do processo de desdiferenciação das células dos tecidos dos explantes, e progride, por meio de divisões celulares, basicamente pela presença de reguladores de crescimento, ou da própria constituição química do meio nutritivo (WAREING; AL-CHALABI, 1985).

### 3.2 Experimento 2 – Multiplicação *in vitro* de *Xylopia aromatica* sob diferentes concentrações de sacarose

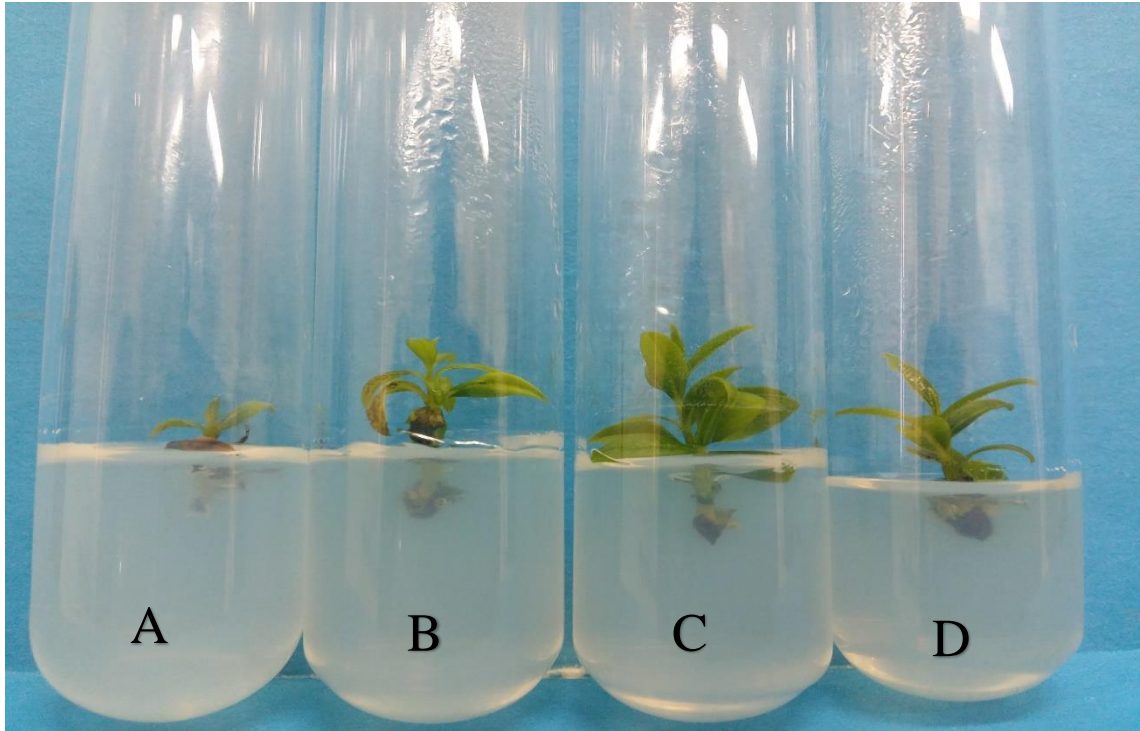
Foram encontradas diferenças significativas em relação ao número de brotações emitidas, entre os tratamentos no cultivo inicial e subcultivo 1 (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultado da análise de variância para número de brotações emitidas por explante de *Xylopia aromatica* em função das concentrações de sacarose, no cultivo inicial e subcultivo 1

FV	GL	Quadrados médio	
		Cultivo Inicial	Subcultivo 1
Tratamento	3	16,3498*	0,8466*
Resíduo	12	0,4413	0,0316
CV (%)		26,25	46,21

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação; \* Diferença significativa a 5% de significância.

No cultivo inicial, concentrações a partir de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, mostraram-se eficientes na indução de brotações, porém, a partir de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose observa-se visualmente o efeito positivo na qualidade das brotações devido ao acréscimo desse elemento no meio de cultura (Figura 5).

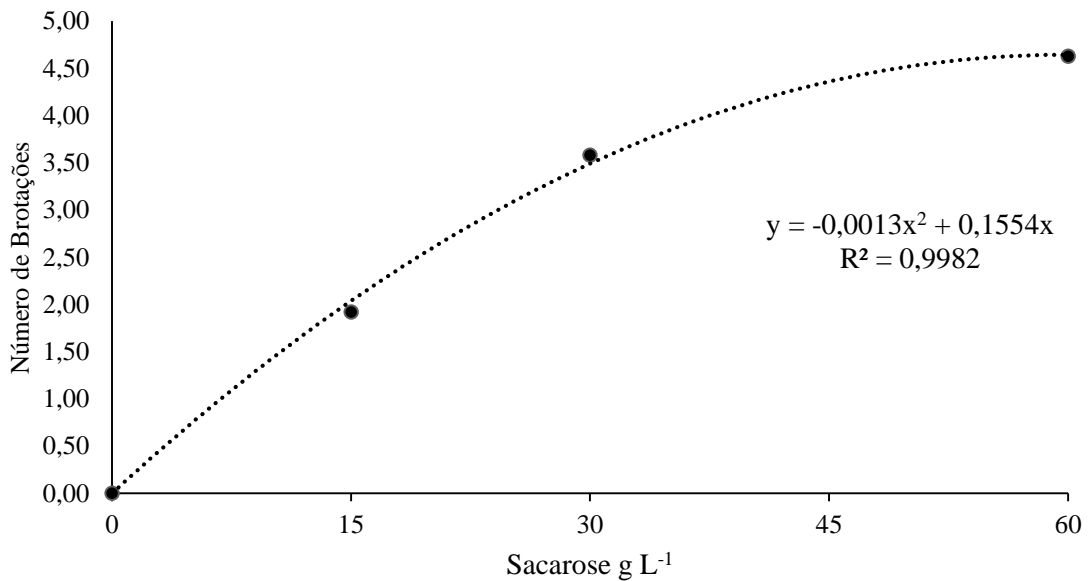


**Figura 5:** Multiplicação de explantes de *Xylopia aromatica* no cultivo inicial, em função de concentrações de sacarose. A) 0 g L<sup>-1</sup>, B) 15 g L<sup>-1</sup>, C) 30 g L<sup>-1</sup> e D) 60 g L<sup>-1</sup>.

A sacarose desempenha um papel importante em culturas *in vitro* ao fornecer carbono e energia para as plantas (GEORGE et al., 2008). Segundo XAVIER et al. (2013), na condição *in vitro* as plantas normalmente crescem em condição heterotrófica, dependendo de uma fonte externa de energia. Fato ocorrido neste trabalho, onde houve pior desempenho dos explantes quando não foi utilizada uma fonte energética em meio de cultura (0 g L<sup>-1</sup> de sacarose).

O número de brotações dos explantes em função das concentrações de sacarose apresentou uma tendência quadrática, sendo observado aumento a medida em que a concentração de sacarose foi aumentando no cultivo inicial (Figura 6).



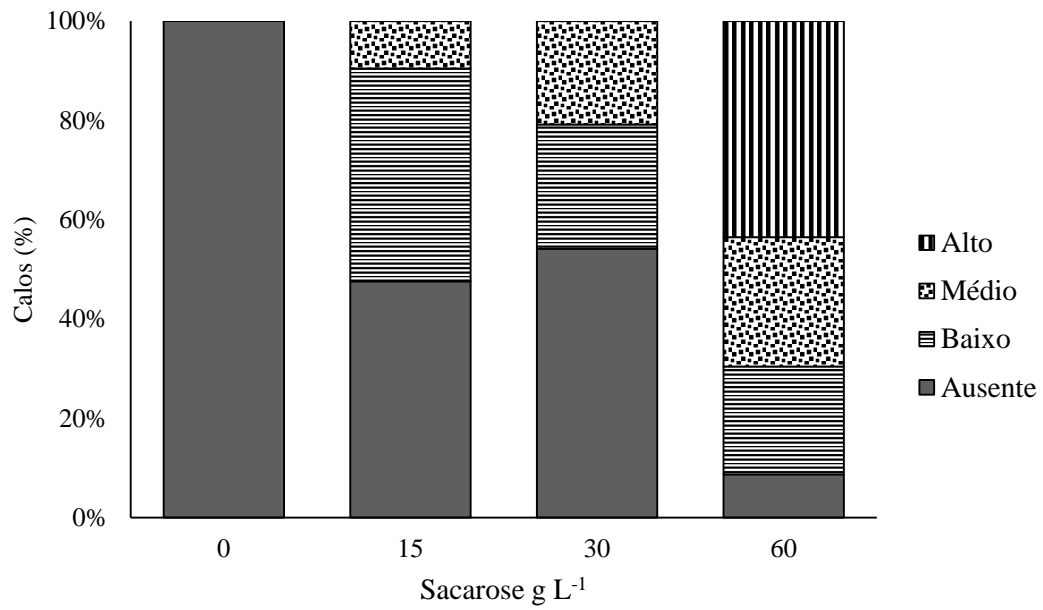


**Figura 6:** Valores médios observados para a característica número de brotações por explantes de *Xylopia aromatica*, em função das concentrações de sacarose, no cultivo inicial.

Na fase de multiplicação de *Dioscorea multiflora*, SOUZA et al. (2011), testando concentrações de sacarose e BAP, verificaram que a concentração de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou maior número e comprimento de brotações. Moritz et al. (2009), avaliando as concentrações 30, 60, 90 e 120 g L<sup>-1</sup> de sacarose para *Ocotea porosa* (imbuia), verificaram que a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> foi a que proporcionou maiores taxas de multiplicação para a espécie.

Ribeiro et al. (2008), avaliando concentrações 0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> sacarose em meio MS para *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng., verificaram que a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> proporcionou maior número e comprimento de brotos. Villa et al. (2004), verificaram que concentrações entre 40 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionaram melhores resultados em números de brotos para o cultivar Tupy de *Rubus* sp. em meio MS.

Foi observado no cultivo inicial a formação de calos. Conforme foi aumentando a concentração de sacarose, o percentual de calos foi se elevando, sendo que os tratamentos 30 e 45 g L<sup>-1</sup> apresentaram percentual de calos ausente, baixo e médio, já no tratamento 60 g L<sup>-1</sup>, mostrou-se um maior percentual de calos (Figura 7).



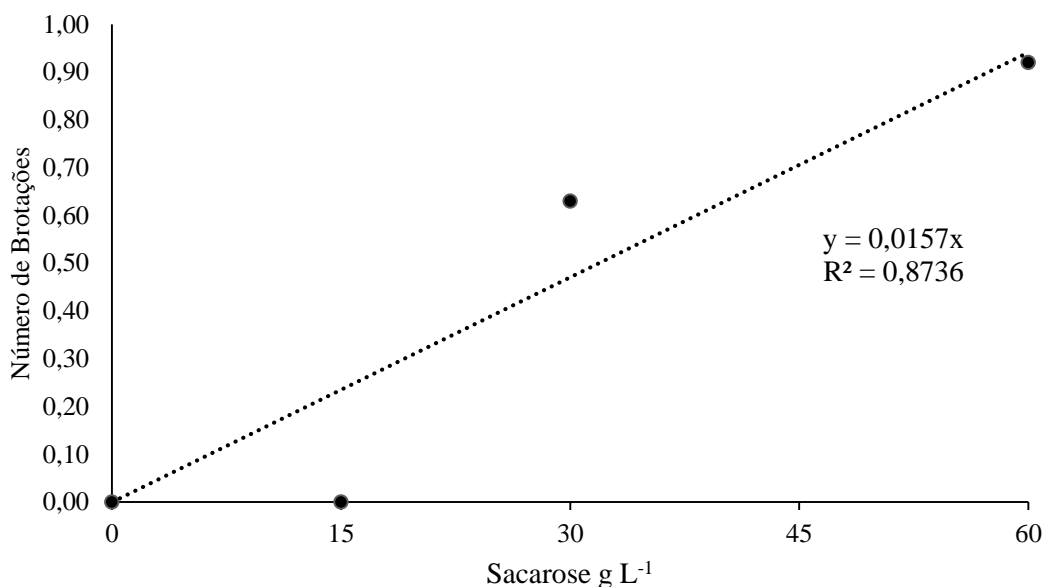
**Figura 7:** Percentual de calos observado em explantes de *Xylopia aromatica*, nas quatro classes de diâmetro (Ausente; Baixo; Médio e Alto) em resposta às concentrações de sacarose no cultivo inicial.

No subcultivo 1, verificou-se mortalidade de todos os explantes do tratamento 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose e redução de brotações nos demais tratamentos, sendo que em 15 g L<sup>-1</sup> não houve novas emissões de brotações (Figura 8).



**Figura 8:** Multiplicação de explantes de *Xylopia aromatica* no subcultivo 1 em função das concentrações de sacarose. A) 0 g L<sup>-1</sup>, B) 15 g L<sup>-1</sup>, C) 30 g L<sup>-1</sup> e D) 60 g L<sup>-1</sup>.

O número de brotações dos explantes em função das concentrações de sacarose apresentou uma tendência linear, sendo observado aumento na emissão de brotações a partir da concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 9).



**Figura 9:** Valores médios observados para a característica número de brotações por explantes de *Xylopia aromatica* em função das concentrações de sacarose, no subcultivo 1.

### 3.3 Experimento 3 – Alongamento com o uso de BAP, ANA e GA<sub>3</sub>

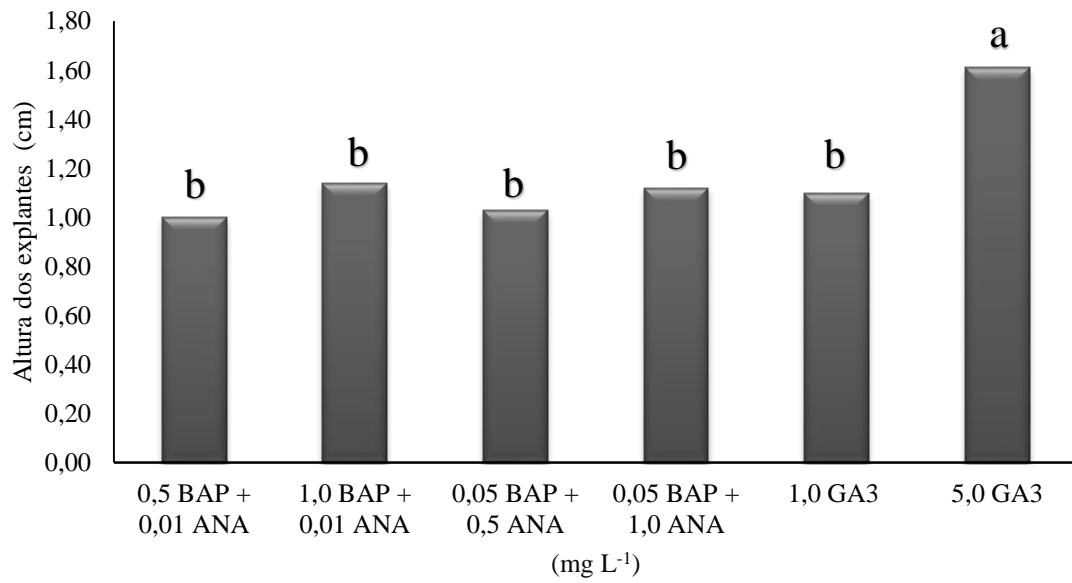
Foram encontradas diferenças significativas para a altura dos explantes em função dos tratamentos, aos 70 dias de avaliação, de acordo com a análise de variância (Tabela 4).

**Tabela 4:** Resultado da análise de variância para altura dos explantes de *Xylopia aromatica*

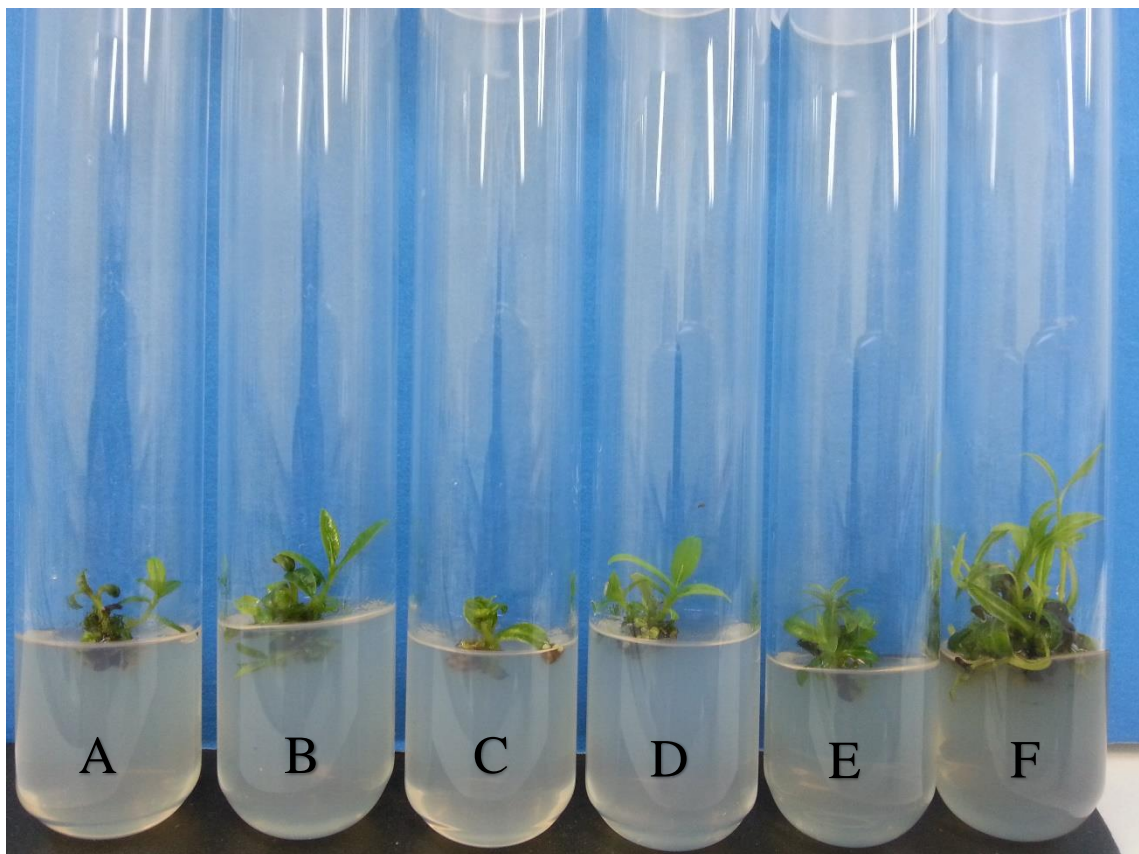
FV	GL	Quadrados médios
Tratamento	5	0,19720*
Resíduo	18	0,0054
CV (%)		6,30

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação; \* Diferença significativa a 5% de significância.

A altura média dos explantes aos 70 dias de avaliação foi de 1,05 cm, sendo observada média de 1,58 cm no tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, que diferiu estatisticamente dos demais (Figura 10 e 11).



**Figura 10:** Altura média dos explantes aos 70 dias de alongamento, em resposta aos tratamentos com BAP x ANA e GA<sub>3</sub>. Médias seguidas por mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.



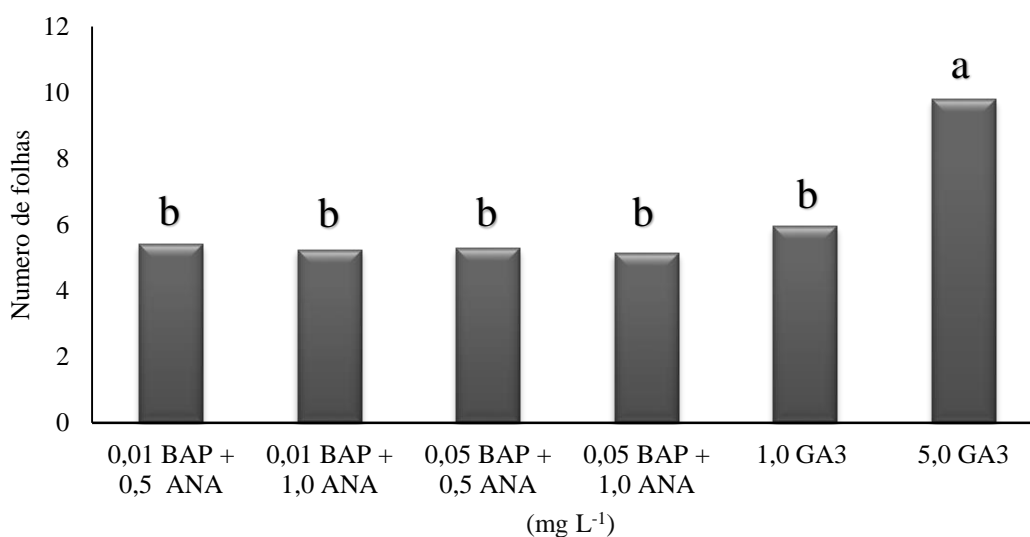
**Figura 11:** Alongamento de explantes de *Xylopia aromatica*. A) 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA, B) 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA, C) 0,05 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA, D) 0,05 mg L<sup>-1</sup> BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA, E) 1,0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> e F) 5,0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>.

Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, em relação ao número de folhas por explante aos 70 dias de avaliação, de acordo com a análise de variância (Tabela 5), sendo que o tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> foi superior aos demais (Figura 12).

**Tabela 5:** Resultado da análise de variância para número de folhas por explante aos 70 dias de alongamento de *Xylopiá aromática*

FV	GL	Quadrados médios
Tratamento	5	13,1879*
Resíduo	18	0,7234
CV (%)		13,87

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação; \* Diferença significativa a 5% de significância.



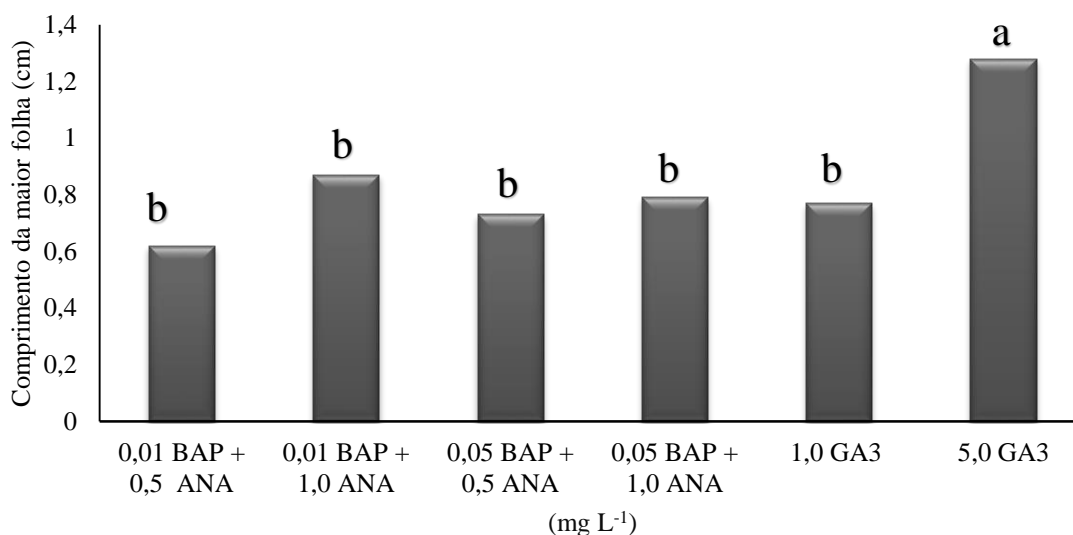
**Figura 12:** Número de folhas em explantes de *Xylopiá aromática* aos 70 dias de alongamento, em resposta aos tratamentos com BAP x ANA e GA<sub>3</sub>. Médias seguidas por mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Para a característica comprimento da maior folha, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 6). O tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> foi superior aos demais, com comprimento médio de 1,28 cm (Figura 13). Não ocorreram alterações morfológicas nas folhas ou plântulas em função dos tratamentos.

**Tabela 6:** Resultado da análise de variância para comprimento da maior folha, aos 70 dias de alongamento de *Xylopia aromatica*

FV	GL	Quadrados médios
Tratamento	5	0,213614*
Resíduo	18	0,01745
CV (%)		15,67

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação; \* Diferença significativa a 5% de significância.



**Figura 13:** Comprimento da maior folha dos explantes aos 70 dias de alongamento, em resposta às combinações de BAP x ANA e GA<sub>3</sub> em diferentes concentrações. Médias seguidas por mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A interação BAP e ANA, em geral proporciona respostas favoráveis ao alongamento *in vitro*. Filter et al. (2014), utilizando meio MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, verificaram altura média dos explantes de 3,71 cm e número médio de 2,2 de folhas formadas em *Malva sylvestris* L. Siqueira et al. (2014), verificaram que 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP proporcionaram maior número de folhas (2,18) e crescimento em altura (3,22 cm) em *Dolichandra unguis-cati* L. Para *Dioscorea rotundata* combinações de ANA e BAP foram importantes na propagação *in vitro*, favorecendo o desempenho da espécie (EZEIBEKWE et al., 2009).

No presente experimento, o tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> foi o que proporcionou melhor resultado na fase de alongamento em comparação aos tratamentos de combinações entre BAP e ANA. Por essa razão foi avaliado de forma mais minuciosa em outro experimento, cujos resultados são apresentados e discutidos no (item 3.4).

### 3.4 Experimento 4 – Alongamento com o uso de GA<sub>3</sub>

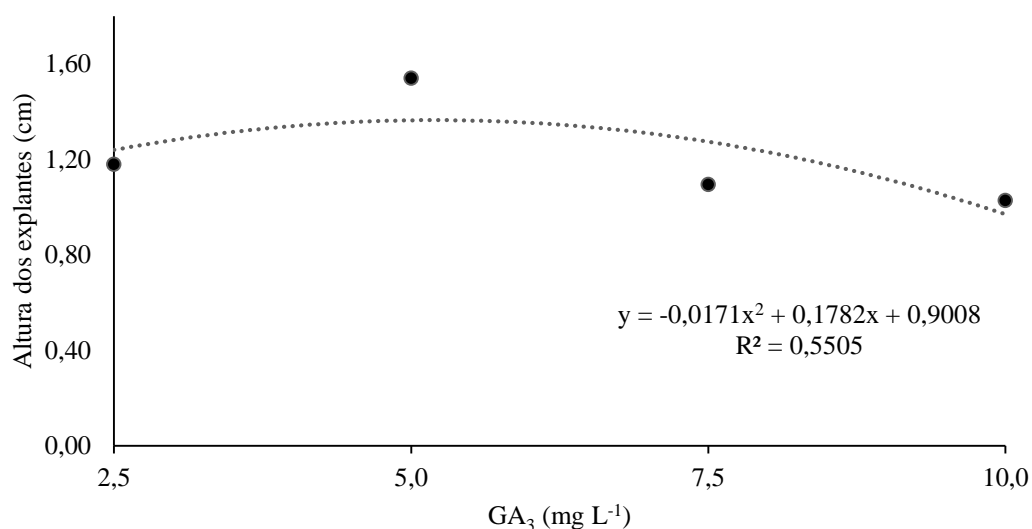
Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, em relação à altura dos explantes aos 40 de avaliação, de acordo com a análise de variância (Tabela 7).

**Tabela 7:** Resultado da análise de variância para a altura de explantes de *Xylopia aromatica*, aos 40 dias, em função das concentrações de GA<sub>3</sub>

FV	GL	Quadrados médios
Tratamento	3	0,207023*
Resíduo	12	0,0040
CV (%)		5,25

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação; \* Diferença significativa a 5% de significância.

A altura dos explantes em função das concentrações de GA<sub>3</sub> apresentou tendência quadrática, sendo observado aumento até a concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup>, cujo valor médio foi de 1,54 cm, e a partir desta houve decréscimo (Figura 14).



**Figura 14:** Valores médios observados para a característica altura de explantes de *Xylopia aromatica*, em função das concentrações de GA<sub>3</sub>, aos 40 dias de alongamento.

As giberelinas têm como principal efeito promover o alongamento de brotações durante a multiplicação *in vitro* e suas respostas variam conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, bem como dependendo da espécie propagada (GEORGE, 2008). O GA<sub>3</sub> é um dos hormônios responsáveis por induzir a expansão celular (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Gomes (1999) observou que concentrações de 1 a 6 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> favoreceu o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de brotações de *Maclura tinctoria*. Simões et al. (2012) verificaram que o ácido giberélico em plantas de *Piper hispidinervum* C. DC. cultivadas *in vitro* estimula o maior investimento na parte aérea do que no sistema radicular, afirmando que a adição ao meio de cultura é vantajosa para a espécie em questão.

Rocha et al. (2009), avaliando a multiplicação e alongamento de *Prunus*, obtiveram resposta linear crescente para o comprimento médio das brotações e número médio de gemas, com o aumento da concentração de GA<sub>3</sub>. No entanto, Pereira et al. (2006), concluíram que para *Uncaria guianensis* a ausência ou presença do hormônio não influenciou o alongamento dos explantes.

Para o número de folhas, não houve diferença significativa entre as concentrações de GA<sub>3</sub> (Tabela 8), indicando que os tratamentos não promoveram diferenças na quantidade de folhas formadas em explantes de *Xylopia aromatica*.

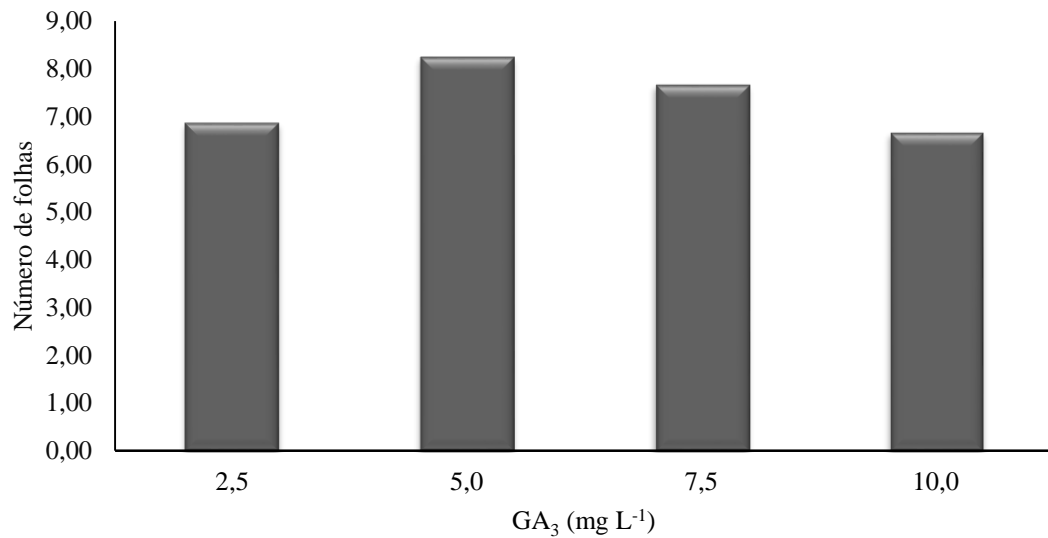
**Tabela 8:** Resultado da análise de variância para número de folhas em explantes de *Xylopia aromatica*, aos 40 dias de alongamento, em função das concentrações de GA<sub>3</sub>

FV	GL	Quadrados médios
Tratamento	3	2,1331 <sup>NS</sup>
Resíduo	12	1,151
CV (%)		14,57

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação; \* Diferença significativa a 5% de significância; <sup>NS</sup> Diferença não significativa a 5% de significância.

Visualmente, nota-se que a concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> foi a que proporcionou maior número de folhas, e a medida em que as concentrações foram maiores, a tendência do número de folhas foi diminuindo (Figura 15).





**Figura 15:** Valores médios observados para a característica número de folhas de *Xylopiya aromatica* em função das concentrações de GA<sub>3</sub>, aos 40 dias de alongamento.

Simões et al. (2012) relatam que a adição de GA<sub>3</sub> no meio de cultura reduziu significativamente o número de folhas de *Piper hispidinervum*. Corroborando com os resultados encontrados para a *Xylopiya aromatica*.

Carvalho et al. (1998) observaram para *Coffea arabica* L., que quanto maior a concentração de GA<sub>3</sub>, maior a emergência de folhas. Rocha et al. (2009), avaliando a variável número médio de folhas, não observaram diferença significativa entre concentrações de GA<sub>3</sub> utilizadas para *Prunus*.

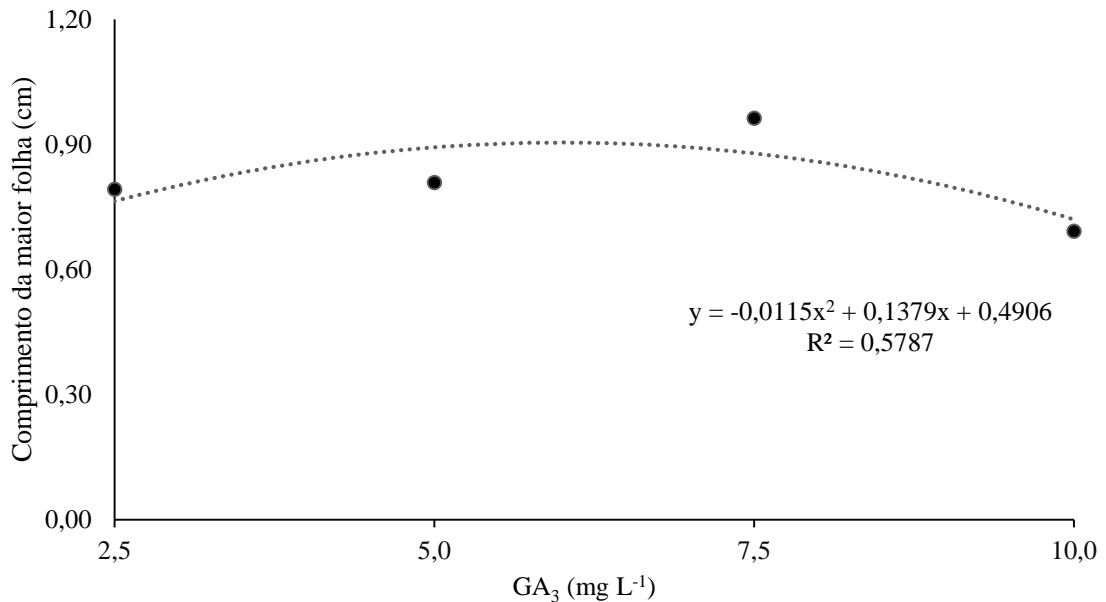
Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao comprimento da maior folha dos explantes, aos 40 de avaliação, de acordo com a análise de variância (Tabela 9).

**Tabela 9:** Resultado da análise de variância para a característica comprimento da maior folha dos explantes de *Xylopiya aromatica* aos 40 dias, em função das concentrações de GA<sub>3</sub>

FV	GL	Quadrados médios
Tratamento	3	0,050044*
Resíduo	12	0,0131
CV (%)		14,12

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de Variação; \* Diferença significativa a 5% de significância.

O comprimento da maior folha dos explantes em função das concentrações de GA<sub>3</sub> apresentou tendência quadrática, sendo observado aumento até a concentração de 7,5 mg L<sup>-1</sup>, cujo valor médio foi de 0,96 cm, e a partir desta houve decréscimo (Figura 16).



**Figura 16:** Valores médios observados para comprimento da maior folha em função das concentrações de GA<sub>3</sub>, para *Xylopiya aromatica* aos 40 dias de alongamento.

A concentração de 7,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, foi a que proporcionou maior crescimento da folha, porém ocorreu alterações morfológicas, fato não desejado nesta fase. Em função desta constatação, o tratamento com 5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, além de apresentar-se satisfatório para a altura dos explantes e número de folhas, apresentou folhas sem alterações.

Fráguas et al. (2004) observaram comprimento de folhas de *Ficus carica* L. de 9,14 cm utilizando a concentração de 6 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, com estiolamento das folhas, corroborando com os resultados encontrados para a *Xylopiya aromatica*.

### 3.5 Experimento 5 e 6 – Enraizamento *in vitro* utilizando AIB e ANA

As concentrações de AIB e ANA utilizadas não foram eficientes na indução de raízes adventícias em *Xylopiya aromatica*.

As auxinas geralmente estimulam a formação de raízes, observando-se alto percentual de enraizamento em explantes juvenis, podendo ser pela maior concentração endógena ou pela sensibilidade dos tecidos à aplicação exógena desse hormônio (ARTECA, 1995).

Deccetti (2000) observou alto percentual de enraizamento e maior número de raízes em *Annona glabra* na ausência de regulador de crescimento.

São inúmeros os entraves que podem ser encontrados ao longo das etapas da micropropagação, sendo um deles o enraizamento *in vitro* de explantes, especialmente no caso de espécies lenhosas (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Heberle (2010), utilizando 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, não verificou enraizamento em *Cordia trichotoma*.

Lemos; Blake (1996) verificaram maiores taxas de enraizamento em *Annona squamosa* com a utilização de ANA ou AIB, ambas em concentrações de 8,0 mg L<sup>-1</sup> na presença de carvão ativado e no escuro.

#### 4 CONCLUSÕES

- O meio MS acrescido de 0,8 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi mais adequado na fase de multiplicação de *Xylopia aromatica*.
- A concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose foi mais adequada para emissão de brotações em *Xylopia aromatica*.
- A concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> foi eficiente no alongamento de *Xylopia aromatica*.
- As concentrações de AIB e o ANA não foram eficientes na fase de enraizamento de *Xylopia aromatica*.
- Por meio dos experimentos realizados, foi possível estabelecer as fases de multiplicação e alongamento de gemas axilares, dando início a um protocolo de micropropagação de *Xylopia aromatica*. A fase de enraizamento requer maiores estudos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ARTECA, R. N. **Plant growth substances: principles and applications**. Pennsylvania: Chapman & Hall, 1995. 332 p.
- AMARAL, V. F. M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrella fissilis* Vell.** 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de Plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI: Embrapa – CNPH, 1998. vol. 1, p. 183-260.
- 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, RS, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 1, p. 87-132, 1998.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; ANTUNES, L. E. C.; SILVA, A. T. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaiaí. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 6, p. 847-851, 1998.
- CHAVES, A. C; SCHUCH, M. W; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.
- DAVIDE, A. C.; MELO, L. A. de. Produção de mudas de candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D. de; DAVIDE, A. C. **O manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Ed. UFLA, Lavras, 2012, p. 43-60.
- DECCETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

- EZEIBEKWE, O.L; EZENWAKA, C.L; MBAGWU, F.N; UNAMBA, C.I.N. Effects os combination of diferente levels of auxin (NAA) and cytokynin (BAP) om *in vitro* propagations of *Dioscorea rotundata* L. (White Yam). **Jornal of Molecular Genetics**, n. 1, p. 18-22, 2009.
- FRÁGUAS, C.B; PASQUAL, M; PEREIRA, A.R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: Efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt**: Experimental Designs Pacakge (Portuguese). R package version 1.1.2. 2013.
- FILTER, M; FREITAS, E.M; PÉRICO, E. Influência de diferentes concentrações dos fitorreguladores ácido 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na propagação vegetativa de *Malva sylvestris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.1, p.47-53, 2014.
- GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J (Ed.). Plant propagation by tissue culture . 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008, 504p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.
- GOMES, G.A.C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria* )**. 1999. 92f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras 1999.
- HEBERLE, M. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arradida ex Steudel)**. 2010 76 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2010.
- KIELSE, P.; FRANCO, E.T.H.; PARANHOS, J.T.; LIMA, A.P.S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1088-1094, 2009.
- LE MOS, E.E.P; BLAKE, J. Micropropagations of juvenile and adult *Annona squamosa*. Plant cell, **Tissue and organ Culture**. N.46, p. 77-79, 1996.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*), by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings**: International Plant Propagator's Society, n. 30, p. 421-427, 1981.

- MALOSSO, M. G.; BERTONI, B. W.; COPPEDE, J. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 6, n. 7, p. 1147-1154, 2012.
- MIRANDA, N. A. **Micropropagação de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)**. 2015 67 f. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ciência Florestal), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.
- MORITZ, A.; DEGENHARDT, J.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A; LIMA, B. H. de; FRANCESCHI, C. do R. B.; FRANCISCON, L. Estabelecimento *in vitro* de *Ocotea odorifera*, *O. catharinensis* e *O. porosa*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 59, p. 37-44, 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- NAGORI, R.; PUROHI, S.D. In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot but differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae** v. 99, p. 89-98, 2004.
- NAVES, V. C. **Propagação *in vitro* da bromélia imperial [*Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms]**. 2001. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- NOBRE, J.; ROMANO, A.; AKSOY, U.; FERGUSON, L.; HEPAKSOY, S. *In vitro* cloning of *Ficus carica* L. adult trees. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 480, p. 161-164, 1998.
- 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, L.M. **Citocininas nos processo anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L.** Tese (Doutorado em agronomia – Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, 2016.
- PELEGRINI, L. L.; RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KOEHLER, H. S. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p. 15271523, 2011.
- PEREIRA, R. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CASTRO, E. M.; SILVA, F. G. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro*

de *Uncaria guianensis* (AUBLET) Gmelin Rubiaceae (UNHA-DE-GATO). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, 2006.

QUISEN R. C.; ANGELO P. C. S. Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônica Ocidental. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44p. (Embrapa Amazônia Ocidental. **Documentos**, 61).

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. Disponível em: <http://www.Rproject.org/> .

RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, 1995.

RIBEIRO, M.N.O.; PASQUAL, M; SILVA, A.B; RODRIGUES, V.A. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, p.101-106 2008.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Journal of Biosciences**, Uberlândia, v. 25, n. 2, p. 69-74, 2009.

RODRIGUES, M. R.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C. OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Plant, v. 48, n. 1, p. 67-72, 2012.

SIMÕES, M.A; VASCONCELOS, J.M; OLIVEIRA, J.P; BELTRÃO, R.T; MANFIO, C.E; JUNIOR, P.C.P.F; RAPOSO, A. Efeito do ácido giberélico GA<sub>3</sub> no alongamento *in vitro* de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidenervum* C. DC.) durante a micropropagação. Amazônia: **Ciência & Desenvolvimento**, Belém, v. 7, n. 14, 2012.

SIQUEIRA, J. FREITAS, E.M; PÉRICO, E. Influência de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de *Dolichandra unguis-cati* (L.) L.G. Lohmann a partir de estacas caulinares. **Heringia**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 69, n. 2, p. 341-346, dezembro 2014.

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

SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; FRANCA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.1, p. 92-98, 2011.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; GOMEZ, E. *In vitro* propagation of Thornless trailing blackberries. **HortScience**, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 310-312, 1981.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 784p.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San José, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

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

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

WAREING, P.F., AL.-CHALABI, T. Determination in plant cells. **Biologia Plantarum** v. 27, p. 241–248, 1985.

WHITE, P.R. Nutricional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, v.2, p.231-244, 1951.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Para a germinação de sementes de *Xylopiya aromatica*, o uso de GA<sub>3</sub> não foi eficiente para quebra de dormência, indicando que se deve buscar outras alternativas ou métodos para superação desta limitação. O uso do AIB não induziu a rizogênese em nenhum dos tipo de estaca. Recomenda-se a realização de trabalhos comparando material juvenil e a utilização de técnicas que promovam o rejuvenescimento para viabilizar a propagação da espécie.
- No cultivo de explantes *in vitro*, o meio de cultura MS com 100% dos sais e vitaminas acrescido de 0,8 mg L<sup>-1</sup> de BAP e concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose é indicado na fase de multiplicação de *Xylopiya aromatica*. A concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> é eficiente para o alongamento, tornando possível estabelecer com sucesso as fases de multiplicação e alongamento de gemas axilares, dando início a um protocolo de micropropagação de *Xylopiya aromatica*. O uso de AIB e ANA adicionados ao meio não foram eficientes para o enraizamento *in vitro*, evidenciando que esta fase necessita de maiores estudos.