



CAMILA VITÓRIA NUNES DE FARIA

ARMAZENAMENTO *in vitro* DE IPÊ AMARELO.

**LAVRAS – MG
2017**

CAMILA VITÓRIA NUNES DE FARIA

ARMAZENAMENTO *in vitro* DE IPÊ AMARELO.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador:
Prof. Ph.D. Renato Paiva

Coorientador:
Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

**LAVRAS – MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Faria, Camila Vitória Nunes de.

Armazenamento *in vitro* de Ipê Amarelo / Camila Vitória
Nunes de Faria. - 2017.

82 p. : il.

Orientador(a): Renato Paiva.

Coorientador(a): Diogo Pedrosa Corrêa da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Handroanthus serratifolius*. 2. Crescimento Lento. 3.
Criopreservação. I. Paiva, Renato . II. Silva, Diogo Pedrosa Corrêa
da. III. Título.

CAMILA VITÓRIA NUNES DE FARIA

ARMAZENAMENTO *in vitro* DE IPÊ AMARELO.

***In vitro* STORAGE OF IPÊ AMARELO.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA, 20 de fevereiro de 2017.

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho, EMBRAPA Café

Dra. Michele Valquíria dos Reis, UFLA

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva, UFLA

Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori, UFLA

Prof. Ph.D. Renato Paiva
Orientador

Coorientador:
Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

**LAVRAS – MG
2017**

Ao meu pai, meu grande amigo,

A minha mãe, minha grande guerreira,

OFEREÇO

Às tias-madrinhas Rosângela e Maria Luisa (in memorian),

À vó Lucy (in memorian),

Por me guiarem eternamente,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me darem forças e guiarem meus passos todo tempo.

Aos meus pais, Antônio e Rosa, pelo amor incondicional, pela fé e paciência, por todo apoio e incentivo aos meus sonhos. Por serem colo e afago, mesmo a quilômetros de distância. Por aceitarem minhas ausências, confortarem minhas angústias e aconselharem minhas decisões. Por nunca medirem esforços para que eu chegasse até aqui. A vocês que participaram de cada momento, vibraram com cada vitória e sofreram com cada lágrima, nunca farei o bastante para agradecê-los. Essa conquista é tão minha quanto de vocês!

À tia Rosângela por me cuidar e me iluminar todos os dias de onde estiver.

À vó Lucy por me dar forças e não permitir que eu jamais desistisse de onde estiver.

À tia Maria por me abraçar e me amar em todos os momentos de onde estiver.

Ao Renato, por toda paciência, ajuda e carinho até mesmo estando longe. Por me ajudar a crescer e por apoiar todas as minhas ideias e decisões, por mais malucas que fossem.

À Amorzinha, por ser minha companheira, alegrar meus dias, me consolar nas horas difíceis, me ensinar tanto e me amar tão puramente.

A família que Lavras me deu, Zé, Gabriel e especialmente, Cleicy minha mãe de coração, por me acolherem em suas vidas e estarem, mesmo de longe, sempre presentes na minha.

À minha madrinha France, por todo incentivo, carinho e ajuda que jamais poderei retribuir.

A todos os amigos que de alguma forma, estiveram presentes, distantes ou não, durante esses anos.

A Tininha, por me levar ao ipê amarelo. Eu disse que defenderia por nós duas, café do meu leite!

Ao meu orientador Renato Paiva, pela oportunidade de realizar o doutorado, pelos ensinamentos, conselhos e orientação.

Ao Diogo, pela paciência, toda ajuda, coorientação e carinho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pelos ótimos momentos vividos, por todas as experiências compartilhadas e toda ajuda que me deram. Especialmente Marisa, Dani, Rodrigo Therezan, Júnia, Rafas, Camila, Thalita... Levarei pra vida!

A todos os professores do Setor de Fisiologia Vegetal por terem contribuído de alguma forma na minha formação.

Aos funcionários do setor de Fisiologia Vegetal, pela prestatividade, carinho e amizade durante esses anos. Em especial a Lena, que verá lá de cima essa tese se tornar real.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de cursar o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles, que de alguma forma, estiveram presentes e contribuíram para que tudo isso se concretizasse.

MUITO OBRIGADA

*“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos.
Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para nosso próprio aprendizado.
Nunca esquecendo o mais importante: nada nessa vida é por acaso.
Absolutamente nada.
Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível.
A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”*

Chico Xavier

RESUMO GERAL

O *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose, esta frequentemente ameaçado devido ao desmatamento excessivo e a ocupação desordenada do Cerrado. Dessa forma, é importante que técnicas sejam desenvolvidas a fim de preservar espécies que ocorram neste bioma como é o caso do ipê amarelo. Para isso, várias técnicas são utilizadas variando o período de conservação em que o material ficará preservado. Dentre essas técnicas, podem-se destacar a produção e armazenamento de sementes sintéticas, o crescimento lento e a criopreservação que correspondem a período curto, médio e longo de armazenamento, respectivamente. Assim, objetivou-se realizar a conservação de *H. serratifolius* nesses diferentes prazos e estudar a regeneração e o desenvolvimento após o armazenamento dessas plantas. Para as sementes sintéticas, primeiramente foi avaliado o efeito de 0,25 μ M de ANA e BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 μ M) em meio WPM na regeneração de gemas laterais de ipê amarelo durante 30 dias. Feito isso, foi avaliada a constituição das cápsulas das sementes sintéticas através da variação do meio WPM ou WPM/2 e a porcentagem de alginato de sódio (2, 3 e 4%) durante 30 dias. Para o armazenamento de sementes sintéticas foi realizado um pré tratamento com solução de sacarose nas concentrações de 0, 25, 50 e 75 M de sacarose por 16 horas em agitação. Posteriormente, as sementes foram armazenadas a 8, 15 e 25°C no escuro e foram avaliados a cada 15 dias durante 2 meses. Para o crescimento lento, segmentos nodais foram inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de sacarose (30, 45 e 60 g/L) e colocados a 8 e 15°C durante 6 meses e mensalmente, os segmentos foram subcultivados. Para esses experimentos, foram avaliados a porcentagem de regeneração, o número de brotos, número de folhas, formação de calos e a oxidação. Para a criopreservação, a *Droplet Vitrification* e a *PVS2 Vitrification* foram testadas sendo que a permanência no PVS2 foi avaliada variando os tempos em (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos) respectivamente. Após 30 dias a porcentagem de regeneração foi avaliada. A melhor porcentagem de regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* foi em meio de cultivo WPM com 0,25 μ M de ANA e 1,0 μ M de BAP. Foi possível produzir sementes sintéticas de *H. serratifolius* a partir de segmentos nodais, sendo indicado o uso de matriz de alginato de sódio de 3% dissolvida em meio WPM meia força. O armazenamento de sementes sintéticas é viável durante 56 dias, na temperatura de 15°C principalmente com pré-cultivo em meio líquido contendo 0,25M de sacarose. A criopreservação de segmentos nodais de *H. serratifolius* foi de 53,3% após exposição à solução vitrificante PVS2 por 15 minutos. É possível armazenar segmentos nodais de *H. serratifolius* por seis meses à 15°C com sobrevivência de 70% com adição de 60g de sacarose.

Palavras-chave: *Handroanthus serratifolius*. Preservação. Cerrado.

GENERAL ABSTRACT

Handroanthus serratifolius (Vahl) S. O. Grose, is a threatened species due to excessive deforestation and disorderly occupation of the Cerrado. Thus, it is important that techniques are developed in order to preserve species that occur in this biome as is the case of yellow ipe. For this, several techniques are used varying the period of conservation in which the material will be preserved. Among these techniques, we can highlight the production and storage of synthetic seeds, slow growth and cryopreservation that correspond to short, medium and long storage periods, respectively. The objective of this work was to carry out the conservation of *H. serratifolius* in these different time periods and to study the regeneration and development after storage of these plants. For the synthetic seeds, it was evaluated the effect of 0.25 µM of NAA and BAP (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 µM) in WPM medium on the regeneration of lateral buds of yellow ipê during 30 days. After that, the constitution of the capsules of the synthetic seeds was evaluated through the WPM or WPM/2 medium variation and the percentage of sodium alginate (2, 3 and 4%) for 30 days. For the storage of synthetic seeds, a pre-treatment with sucrose solution at the concentrations of 0, 25, 50 and 75 grams of sucrose was carried out for 16 hours under stirring. Subsequently, the seeds were stored at 8, 15 and 25 °C in the dark and were evaluated every 15 days for 2 months. For the slow growth, nodal segments were inoculated into WPM medium with different concentrations of sucrose (30, 45 and 60 grams) and placed at 8 and 15 °C for 6 months and monthly the segments were subcultured. For these experiments, the percentage of regeneration, number of shoots, number of leaves, callus formation and oxidation were evaluated. For cryopreservation, droplet vitrification and PVS2 vitrification were tested and the permanence time in PVS2 was evaluated by varying the times in (0, 30, 60, 90 and 120 minutes) and (0, 15, 30, 45, 60, 75 And 90 minutes) respectively. After 30 days the regeneration percentage was evaluated. The best percentage of *H. serratifolius* nodal segment regeneration was in WPM culture medium with 0.25 µM NAA and 1.0 µM BAP. It was possible to produce synthetic seeds of *H. serratifolius* from nodal segments and the use of 3% sodium alginate matrix dissolved in half strength WPM medium is indicated. The storage of synthetic seeds is feasible for 56 days, at a temperature of 15 °C, mainly with preculture in a liquid medium containing 0.25M of sucrose. The cryopreservation of *H. serratifolius* nodal segments was 53.3% after exposure to the PVS2 vitrification solution for 15 minutes. It is possible to store nodal segments of *H. serratifolius* for 6 months at 15 °C with the survival of 70% with the addition of 60g of sucrose.

Keywords: *Handroanthus serratifolius*. Preservation. Cerrado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Descrição da espécie	11
2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	13
2.3 Conservação <i>in vitro</i>	13
2.3.1 Sementes sintéticas	14
2.3.2 Crescimento lento	15
2.3.3 Criopreservação	17
3 REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 1: Armazenamento de sementes sintéticas de <i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S. O. Grose	
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Obtenção do material vegetal	28
2.2 Armazenamento de sementes sintéticas	29
2.2.1 Desenvolvimento de segmentos nodais.....	29
2.2.2 Constituição da matriz de encapsulamento e porcentagem de alginato	29
2.2.3 Armazenamento de sementes sintéticas	30
2.5 Estatística	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 Desenvolvimento de segmentos nodais	30
3.2 Constituição da matriz de encapsulamento e porcentagem de alginato de sódio	35
3.3 Armazenamento de sementes sintéticas	37
4 CONCLUSÃO	50
5 REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 2: Crescimento lento e criopreservação de <i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S. O. Grose	
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Obtenção do material vegetal	58
2.2 Crescimento lento	59
2.2.1 Aclimatização	60
2.3 Criopreservação	60

2.3.1 Droplet Vitrification	60
2.3.2 PVS2 Vitrification	61
2.4 Estatística	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1 Crescimento lento	62
3.1.1 Aclimatização	70
3.2 Droplet vitrification	73
3.3 PVS2 Vitrification	75
4 CONCLUSÃO	78
5 REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é um dos principais biomas brasileiros e abrange cerca de 24% do território nacional (IBGE, 2011). O bioma apresenta uma elevada biodiversidade vegetal, com cerca de 7.000 espécies, e dessas, 44% são consideradas endêmicas (KLINK; MACHADO, 2005). Cerca de 55% do Cerrado vem sofrendo constantemente com o desmatamento causado não só pela expansão agrícola como também pelo aumento da população de forma desordenada e a consequente ocupação desse bioma (GALHARTE; CRESTANA, 2010; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

Dentre as espécies encontradas neste bioma podemos destacar a *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose, conhecida popularmente como ipê amarelo. É uma espécie arbórea de grande interesse econômico devido ao seu potencial madeireiro, tanto para marcenaria quanto para construção civil, e seu uso ornamental por apresentar uma florada amarela bastante vistosa e bela (FERREIRA et al., 2004). Além disso, essa espécie é empregada na medicina popular por possuir efeitos contra tipos de câncer, lúpus, Parkinson, psoríase e alergias. Possui ainda propriedades anti-infecciosas, antifúngicas, diuréticas e adstringentes (EVNGELISTA JUNIOR et al., 2006).

A reprodução do *H. serratifolius* ocorre por meio das inúmeras sementes liberadas pela planta (DOUSSEAU et al., 2008). Contudo, apesar de serem ortodoxas, estas sementes podem perder a viabilidade rapidamente (SANTOS et al., 2009; SILVA et al., 2011). Devido tal problema de armazenamento da espécie, a busca por métodos eficazes de conservação é de fundamental importância.

Dessa forma, o cultivo *in vitro* pode ser uma ferramenta importante para a propagação de espécies nativas que apresentam algum entrave na propagação, além de ser um método eficaz de conservação, proporcionando a inclusão e a manutenção de espécies, em bancos de germoplasma *in vitro* (KELLER et al., 2013).

Para a manutenção de diversas espécies do Cerrado como o *H. serratifolius* frente ao rápido desmatamento, a conservação *ex situ*, por meio de bancos de sementes, criobancos e bancos de germoplasma podem ser adotados (RAI et al., 2009). Essas estratégias de conservação *ex situ* são consideradas complementares à conservação *in situ* e servem para assegurar a conservação de espécies ameaçadas ou que estão sofrendo erosão genética (ENGELMANN, 2011; VOLIS; BLECHER, 2010).

Dentre as técnicas de conservação *in vitro* destaca-se a produção de sementes sintéticas, com importante aplicação em estudos de micropropagação e conservação *in vitro*

de germoplasma (PEREIRA et al., 2008). Essa técnica consiste no encapsulamento de embriões somáticos, ápices caulinares ou segmentos nodais em uma matriz de alginato (SANOVAL-YUGAR et al., 2009). Possui amplo uso na conservação, pois os explantes ficam completamente envolvidos e protegidos, facilitando o manuseio e possibilitando o intercâmbio de material genético e armazenamento, principalmente, em curto prazo.

Outra técnica de conservação *in vitro* é o crescimento lento (*Slow Growth Storage* – SGS), sendo utilizada para armazenamento em médio prazo (ENGELMANN, 2011). O objetivo dessa técnica consiste em desacelerar (paralisar) o crescimento aumentando ao máximo o intervalo entre os subcultivos, ou até mesmo estendê-los indefinidamente através da alteração na constituição do meio de cultura e ou do ambiente, como por exemplo a redução da temperatura e da intensidade luminosa (ENGELMANN, 2011).

Além dessas duas técnicas, outra bastante promissora para a conservação, é a criopreservação que consiste em conservar o material biológico vivo por período indeterminado, a ultra-baixa temperatura (-196 °C), sem que este perca a sua viabilidade (ENGELMANN, 2011). As coleções são mantidas em pequenos espaços, permanecem protegidas de contaminação e requerem pequena manutenção (ENGELMANN, 2004).

Pesquisas que visem seu estabelecimento *in vitro* e melhores formas de conservação a curto, médio e longo prazo, bem como os efeitos causados pelas mesmas no desenvolvimento de plantas de *H. serratifolius* são de grande importância.

Souza et al, (2014) obtiveram sucesso com criopreservação de embriões zigóticos de *H. serratifolius*. Porém, os estudos de conservação ainda são incipientes bem como outros propágulos a serem utilizados.

Dessa forma, objetivou-se realizar a conservação de *H. serratifolius* a curto, médio e longo prazo e estudar a regeneração e o desenvolvimento após a conservação dessas plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

O gênero *Tabebuia* é um gênero polifilético, ou seja, aquele em que o ancestral não é comum a todos os indivíduos. Dessa forma, espécies que contenham madeiras muito densas com grandes quantidades de lapachol, uma naftoquinona conhecida por suas propriedades anticancerígenas, além de propriedades antiinflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária antitripanossoma, e antiulcerogênica (ARAÚJO; ALENCAR; NETO, 2002), foram colocadas

no gênero *Handroanthus*. Assim, *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose é o nome que substituiu o antigo da espécie *Tabebuia serratifolia* nos rearranjos taxonômicos (GROSE; OLMSTEAD, 2007).

O *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose, pertence à família das Bignoniaceae e é popularmente conhecida como Ipê-amarelo ou Pau d'arco. A espécie é encontrada nos países da América Latina com registros na Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. No Brasil, ocorre nas regiões Amazônicas, Nordeste, até a região Sudeste sendo encontrada em diferentes biomas incluindo Floresta Tropical e Cerrado, sendo característica das florestas de terra firme, floresta estacional perenifólia, floresta ombrófila e floresta ombrófila densa (FERREIRA, et al., 2004; LOHMANN, 2015).

As árvores são normalmente encontradas em áreas de borda de matas ou isoladas em áreas abertas, como em pastagens. São árvores de médio porte com tronco esguio e casca grossa e são utilizadas para fins madeireiros (como na construção civil, naval e moveleira), paisagístico, reflorestamento de áreas degradadas e propósitos medicinais (AWALE et al., 2005).

No paisagismo ela se destaca na arborização urbana uma vez que sua florada é caracteristicamente exuberante pela vasta ocorrência de flores amarelas (FERREIRA et al., 2004; DOUSSEAU et al., 2008). Já na medicina popular, todas as partes de *H. serratifolius*, principalmente cascas, folhas e flores, são utilizadas para tratamento de câncer do pâncreas, esôfago, intestino, pulmões, próstata e língua (EVANGELISTA JUNIOR et al., 2006), com pesquisas em andamento visando comprovar tais usos (SALUSTIANO et al., 2010). Além disso, é empregado em doenças como de Hodgkin, leucemia, lúpus, Parkinson, psoríase e alergias. Conta também com propriedades diuréticas, analgésicas e fungicidas, sendo utilizados popularmente para clorose, diarreia, enurese, faringite, feridas, picadas de cobra, sífilis, entre outras (EVANGELISTA JUNIOR, et al., 2006).

O *H. serratifolius* é uma árvore com folhagem serrilhada do tipo decídua. Seus frutos amadurecem rapidamente liberando uma grande quantidade de sementes aladas durante a estação seca ou início das chuvas, ocorrendo de setembro a dezembro (LORENZI, 1992; RODRIGUES, et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2004). As sementes não possuem dormência sendo classificadas como ortodoxas, podendo ser armazenadas sob refrigeração, em embalagens impermeáveis, após a secagem (FERREIRA et al., 2004; SILVA et al., 2011). No entanto, apresentam problemas de germinação e conservação (OLIVEIRA et al., 2004), já que possuem baixa longevidade em ambiente natural (FERREIRA et al., 2004; SILVA et al., 2011). Este problema se deve a pequena quantidade de reservas encontradas nos cotilédones

de espécies que pertencem a esse gênero. Além disso, grande parte da sua composição química, entre 20 e 30%, é constituída de óleo (DEGAN et al., 1997), e sementes que tem essa característica tendem a perder a viabilidade mais facilmente que as ricas em proteínas e carboidratos, por causa da maior instabilidade química dos lipídios (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

2.2 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* consiste em um conjunto de diferentes técnicas que se apresentam como uma alternativa para a propagação de espécies de plantas com dificuldade de germinação, além de permitir a produção em larga escala ou ainda à inclusão de espécies em bancos de germoplasma (PINHAL et al., 2011). Isso ocorre em curto período de tempo e espaço reduzido, em excelentes condições fitossanitárias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001).

O sucesso da cultura de tecidos depende de vários fatores como: o equilíbrio na utilização de reguladores de crescimento, disponibilidade de nutrientes, além de fotoperíodo, qualidade de luz e temperatura (PINHAL et al., 2011; GEORGE; HALL; KLERK; 2008).

Por isso, é necessário o estabelecimento de protocolos para cada espécie estudada (PINHAL, 2011). Para a propagação *in vitro* de *Handroanthus* e *Tabebuia* as pesquisas são limitadas a espécies específicas. A germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich e um protocolo de indução de brotações adventícias de *Tabebuia donnell-smithii* foram publicados por Dousseau et al. (2008). Para a conservação de *H. serratifolius*, são poucos os trabalhos na literatura em geral. Souza, et al. (2014) obtiveram 85% de germinação ao criopreservar embriões zigóticos através da *droplet vitrification*.

2.3 Conservação *in vitro*

A conservação de germoplasma de espécies nativas com alto potencial comercial, seja ele ornamental, para consumo ou farmacológico, tem sido usado para preservar a variabilidade genética e permitir o estudo de suas propriedades num ambiente controlado através do emprego de técnicas de cultivo *in vitro* (FORD-LLOYD; JACKSON, 1991; VILLALOBOS et al., 1991; BERTONI et al., 2010). O estabelecimento de um protocolo *in*

in vitro para a conservação de uma espécie selvagem permite a criação de bancos de dados de referência para futuros estudos de outras espécies (CORDEIRO et al., 2012).

O processo de conservação baseia-se em controlar o crescimento dos explantes viáveis, reduzindo-o ou paralisando-o, manipulando tanto a constituição do meio de cultura como as condições de manutenção das culturas *in vitro* (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

Esta prática, por sua vez, maximiza o intervalo entre subculturas, reduzindo assim a mão de obra, o espaço de armazenamento, a despesa total e a possível contaminação. O método de conservação deve permitir o acesso imediato ao germoplasma de interesse e manter a diversidade genética sem comprometer sua estabilidade (ENGELMANN, 2004; SHIBLI et al., 2006; RAI et al., 2009).

Esses métodos dependem do tipo de cultura utilizada. Conseqüentemente, vários protocolos alternativos foram desenvolvidos para se adaptarem às espécies conservadas, tipo de explante e tempo de armazenamento, a fim de manter a capacidade de recuperação da cultura (ENGELMANN, 2004; SHIBLI et al. 2006).

Várias são as técnicas utilizadas para a conservação *in vitro* de espécies que podem permitir que essa conservação ocorra por diferentes períodos de tempo. Em curto prazo, destaca-se, por exemplo, o armazenamento de sementes sintéticas. Já em médio prazo, o crescimento lento é uma técnica bastante empregada para esse fim. Em longo prazo por sua vez, a criopreservação obtém grande sucesso quando utilizada.

Portanto, é de extrema importância que estudos direcionados a *H. serratifolius* sejam realizados a fim de estabelecer métodos eficientes de conservação desta espécie por diferentes períodos como a produção de sementes sintéticas, o crescimento lento e a criopreservação.

2.3.1 Sementes sintéticas

O termo semente sintética surgiu através do encapsulamento de embriões somáticos em cápsulas de hidrogel, proposto por Redenbaugh et al. (1986), tendo como principais vantagens a proteção dos embriões somáticos, o fácil armazenamento, transporte e conversão em plantas (ONISHI et al., 1994, GUERRA et al., 1999).

Porém, atualmente, o desenvolvimento de sementes sintéticas é uma modalidade de cultura de tecidos de plantas, que consiste em encapsular não só embriões somáticos, como os mais variados propágulos, dentre eles ápices caulinares ou gemas axilares (CID, 2012). Isso é

possível devido ao uso de substâncias que formam uma cápsula gelatinosa em volta do explante sendo bastante utilizado para este fim, o alginato de sódio.

Essa técnica é bastante empregada para a micropropagação, possuindo a capacidade de rebrota e o desenvolvimento de plântulas (conversão) para utilização *in vitro* e *ex vitro*, e também para a troca de germoplasma com potencial capacidade de armazenamento, apresentando facilidade de manuseio, restrições de quarentena limitadas e baixo custo de produção (GERMANÀ et al., 2007; MICHELI et al., 2007; RAI et al., 2008; SINGH et al., 2009).

Além disso, são bastante empregadas na conservação de espécies uma vez que seus explantes ficam completamente envolvidos e protegidos facilitando o manuseio e possibilitando ainda o intercâmbio de material genético, manutenção da identidade clonal, independência de efeitos sazonais e armazenamento a curto e médio prazo sem perder a viabilidade (RAI et al., 2009).

O sucesso da propagação através de sementes sintéticas é altamente influenciado pela composição utilizada na formação da cápsula. Tanto o alginato de sódio quanto o cloreto de cálcio desempenham um importante papel na complexação e na qualidade da cápsula. A cápsula é a responsável pela proteção e a disponibilização de nutrientes para o explante. E a disponibilização de nutrientes pela cápsula facilita o crescimento e sobrevivência do explante e possibilita sua germinação (SINGH et al., 2010).

Apesar de todo o potencial da técnica, são relativamente poucos os estudos acerca do tipo de explante, constituição e consistência da cápsula, condições de cultivo e armazenamento das sementes sintéticas. Em geral, as pesquisas sobre encapsulamento envolvem o emprego de embriões somáticos como fonte de explantes (CASTILLO et al., 1998; ARA et al., 1999), havendo, assim, poucos trabalhos utilizando outros tipos de explantes como sementes sintéticas (GANAPATHI et al., 1992; NASSAR, 2003; SONEJI et al., 2002), sendo incipientes os estudos para *H. serratifolius*.

2.3.2 Crescimento lento

O método de crescimento lento consiste em desacelerar ou suprimir drasticamente o metabolismo fisiológico do vegetal, diferentemente da criopreservação em que, por longos períodos, o material vegetal é armazenado em temperaturas ultra-

baixas, suprimindo o crescimento, de forma a evitar a deterioração do material vegetal (WITHERS ; WILLIAMS, 1998).

Esse método tem sido utilizado para a conservação a curto e médio prazo, principalmente de meristemas e/ou ápices caulinares de várias espécies e consiste na redução do crescimento e no aumento dos intervalos entre os subcultivos, sem afetar significativamente a viabilidade dos explantes (ENGELMANN, 2011).

Isto pode ser alcançado alterando-se o potencial osmótico do meio de cultura, reduzindo então a disponibilidade de água, ou utilizando retardantes vegetais (especialmente inibidores da biossíntese de giberelinas). Pode-se também reduzir a luminosidade e a temperatura da sala de incubação, de tal maneira a obter o crescimento mínimo *in vitro* (WITHERS; WILLIAMS, 1998; RADEMACHER, 2000; CASTRO; HILHORST, 2004; SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011). Entretanto, o sucesso desta técnica depende muito das características fisiológicas da espécie a ser conservada.

O decréscimo da temperatura (4 à 20°C) e a suplementação do meio nutritivo com osmorreguladores, como por exemplo, sacarose, têm sido utilizados para conservar propágulos de espécies de propagação clonal, como tubérculos, raízes, frutíferas e ornamentais (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

Dessa forma, uma abordagem amplamente utilizada tem sido a adição de agentes osmóticos e a redução da temperatura, em conjunto, na qual as espécies são mantidas. Em geral, temperaturas entre 15 a 20 °C promovem maiores taxas de sobrevivência, associadas a menor taxa de crescimento, sem mudanças morfológicas aparentes e alterações anatômicas dos tecidos vegetais (PEDROSO et al., 2010; SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011). A baixa temperatura aumenta o intervalo de transferência para novo meio e, muitas vezes, independe do tipo e concentração do carboidrato utilizado (LIMA-BRITO et al., 2011).

Essa técnica é bastante importante por permitir a conservação de material de mais fácil regeneração, uma vez que são utilizados segmentos nodais maiores que podem ser levados de uma forma mais rápida e eficiente para o campo por exemplo. Além disso, por reduzir drasticamente o crescimento mantendo o material viável, se torna uma ótima solução para espécies que não estão sendo utilizadas no momento mas que podem vir a ser necessárias novamente em um médio período de tempo.

Portanto, uma ferramenta com relevante potencial para a conservação de espécies como *H.serratifolius in vitro*, sendo que não existe na literatura trabalhos utilizando essa técnica para essa espécie.

2.3.3 Criopreservação

A criopreservação é feita através de técnicas que armazenam o material biológico vivo em nitrogênio líquido (NL) a ultrabaixas temperaturas (-196 °C), resultando na diminuição ou até mesmo na paralisação do metabolismo celular (MELETTI et al., 2007; REED, 2008; KACZMARCZYK et al., 2011).

Atualmente, a criopreservação é o método de conservação que melhor garante o armazenamento em longo prazo de germoplasma. Possui vantagens em relação a outras metodologias como, a redução ou eliminação de danos causados no DNA, diminuição na necessidade de avaliações periódicas e controle da viabilidade, pode contornar problemas como doenças e danos ambientais capazes de afetar materiais conservados por outros métodos, o material é armazenado em pequenos volumes e, teoricamente, pode-se armazená-lo por período de tempo ilimitado (ENGELMANN, 2011; PENCE, 2011).

Porém, um dos entraves encontrados na criopreservação é a quantidade de água intracelular contida no material. Meristemas, embriões ou calos, por exemplo, possuem altas quantidades de água em seu interior. Isso faz com que as células se tornem propícias a lesões graves nas membranas, causadas pela formação de cristais de gelo formados durante o congelamento (REED, 2008). Para que isso não ocorra e conseqüentemente a viabilidade desses materiais seja mantida, é preciso que seja realizada uma desidratação dos tecidos de maneira artificial (ENGELMANN, 2011).

Dessa forma, o sucesso desta técnica é dependente de fatores cruciais já nas etapas iniciais. Uma das formas de se proteger as células, é o acréscimo de substâncias crioprotetoras já no meio de pré-cultivo. Além disso, a determinação do tempo de exposição do material vegetal as soluções crioprotetoras é de extrema importância uma vez que os mesmos podem ser tóxicos dependendo da exposição. O meio pós descongelamento, também é um fator que deve ser avaliado para que a maior regeneração seja alcançada após a imersão no nitrogênio líquido (CASTRO et al., 2013).

Além disso, o congelamento rápido também é importante para a mitigação da formação de cristais de gelo. Isso porque, dessa forma ocorre a vitrificação das células onde a água intracelular passa do estado líquido diretamente para um estado amorfo, solidificando contudo, sem que ocorra a cristalização (ENGELMANN, 2011). Isso pode ser alcançado através do aumento na concentração de solutos, o que faz com que a viscosidade da solução, por sua vez aumente (SANTOS, 2000).

Entretanto, esse é um estado instável, principalmente durante o descongelamento, podendo formar grandes cristais de gelo através do agrupamento de cristais menores, na passagem do estado amorfo para o estado líquido (MAZUR, 1984). Isso pode ser evitado através do descongelamento rápido (BENSON, 2008).

O uso de soluções de vitrificação ou técnicas de desidratação podem beneficiar a formação desse estado amorfo (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008). Em relação às soluções, estas devem ser concentradas a fim de diminuir a quantidade de água celular aumentando a concentração intracelular. Já a desidratação pode ser realizadas em câmara de fluxo, pela exposição à substâncias crioprotetoras, ou pela combinação de técnicas (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005).

É interessante que essas substâncias crioprotetoras apresentam capacidade de penetrar nas células para uma maior osmolaridade das células sem, contudo, serem tóxicas garantindo assim sua máxima eficiência. Entre essas pode-se destacar: a sacarose, o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO) (BENSON, 2008).

Atualmente, as soluções vitrificantes utilizadas de forma mais ampla são as baseadas no uso de glicerol como a *Plant Vitrification Solution* - PVS2 [30% glicerol (p/v), 15% etilenoglicol (p/v), 15% DMSO (p/v), 0,4M sacarose no meio basal de cultura] e PVS3 (40% glicerol, 40% sacarose no meio basal de cultura] (SAKAI; ENGELMANN, 2007; SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990).

A *Droplet Vitrification* é umas das técnicas desenvolvidas recentemente e que tem grande sucesso na regeneração de explantes em que os mesmos são expostos em uma gota de PVS2 em papel alumínio para posterior imersão no nitrogênio líquido após os tempos de exposição (ENGELMANN, 2011).

Souza (2014), criopreservando ápices caulinares de *H. serratifolius* pela técnica da *Droplet Vitrification*, obteve cerca de 54% de retomada de crescimento. Dessa forma, espera-se obter um sucesso maior na conservação de *H. serratifolius in vitro* por meio de outras técnicas utilizadas, alcançando assim uma maior porcentagem de regeneração.

3 REFERÊNCIAS

- ARA, H. et al. Synthetic seed: prospects and limitations. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 12, p. 1438-1444, 1999.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P.J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, p. 57-59, 2002.
- AWALE, S. et al. Neoflavonoids and related constituents from nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 68, n.6, p. 858-864, 2005.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, 2008. p. 15-32.
- BERTONI, B.W. et al. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 209–213. 2010.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- CASTILLO, B. et al. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 17, n. 3, p. 172-176, 1998.
- CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W. Embebeção e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.149-162.
- CASTRO, S.V., et al. Intracellular Cryoprotant Agents: characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 2 p. 957. 2013.
- CID, L.P.B. Sementes Sintéticas: O desenvolvimento de sementes encapsuladas. **Biotecnologia, Ciência ; Desenvolvimento**, Brasília, n.32, p.4-7, 2004.
- CORDEIRO, S.Z. et al. Micropropagation of *Mandevilla moricandiana* (A.DC.) Woodson. **In Vitro Cellular ; Development Biology Plant**. Wallingford v. 48, p. 620–626. 2012.
- DEGAN, P. et al. Composição química, sanidade, secagem e germinação de sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 41-47, 1997.
- DOUSSEAU, S. et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.
- ENGELMANN, F. et al. The development os encapsulation dehydration. In: Reed BM (Ed.) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer Corvallis: Springer, 2008. p. 59-75.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular; Developmental Biology**, New York, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cellular ; Developmental Biology –Plant*, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.
- EVANGELISTA JUNIOR, C. G. et al. Hepatotoxicidade de plantas medicinais. LIII. Ação da infusão de *Tabebuia avellanedae* Lor. ex griseb. no rato. **Revista Científica da Universidade de Franca**, Franca, v.6, n.1, p.13-16, 2006.
- FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo: *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, Manaus, v. 5, p.2, 2004.
- FORD-LLOYD, B.V.; JACKSON, M. T. Biotechnology and methods of conservation of plant genetic resources. **Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 247-256, 1991.
- GALHARTE, C.A.; CRESTANA, S. Avaliação do impacto ambiental da integração lavoura pecuária: Aspecto conservação ambiental no cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.14, n.11, p.1202-1209, 2010.
- GANAPATHI, T. R. et al. Propagation of banana through encapsulated shoot tips. **Plant Cell Reports**, v.11, n.11, p.571-575, 1992.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3ª ed. The Background Springer. v. 1, 709 p, 2008.
- GERMANÁ, M.A. et al. Perspectives of the encapsulation technology in the nursery activity of Citrus. **Caryologia**, Firenze, v. 60, p. 192–197, 2007.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ. p. 183-260. 1998.
- GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**. Laramie, v.32, n. 3, p. 660–670, 2007.
- GUERRA, M. P., TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. v. 2, p. 533-568. 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção agrícola municipal**: culturas temporária e permanentes. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 24 junho 2016.
- KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species what have we learned and where to from here? *In Vitro Cellular; Developmental Biology – Plant*, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2011.
- KELLER, E. R. J. et al., Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germoplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, 2013.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. **A conservação do Cerrado brasileiro**. Belo Horizonte: Megadiversidade, v. 1, n. 1, 2005, p. 148-155.

- LIMA-BRITO, A. et al. *in vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.3, p.501-510, 2011.
- LOHMANN, L.G. *Bignoniaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114074>>.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, 351p. 1992.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 247, n. 3 part 1, p. C125– C142, 1984.
- MELETTI, L. M. M. et al. Criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 6, n. ½, p. 13-20, 2007.
- MICHELI, M.; HAFIZ, I. A.; STANDARDI, A. Encapsulation of *in vitro*-derived explants of olive (*Olea europaea* L. cv. Moraiolo). II. Effects of storage on capsule and derived shoot performance. **Scientia Horticulture**, v. 113, p. 286–292. 2007.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Mapa de cobertura vegetal: Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado/mapa-de-cobertura-vegetal>>. Acesso: 24 de junho de 2016.
- NASSAR A.H. Slow growth storage of encapsulated germplasm of *Coffea arabica* L. **International Journal of Agriculture Biology**, Paquistão, n.5, p.517-520, 2003.
- OLIVEIRA, L. M. et al. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley - (Bignoniaceae) pelo teste de raio X. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 2, p. 138-143, 2004.
- ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y. ; HIROSAWA, T. Synthetic seed as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.39, p.137-145, 1994.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. 1ª ed. Lavras, UFLA/FAEPE, 74p. 2001.
- PEDROSO, A.N.V. et al. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.33, n.3, p.407-414, 2010.
- PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular ; Developmental Biology – Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 176-187, 2001.
- PEREIRA, J.E.S. et al. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.26, p. 093-096, 2008.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 501-531, 2000.

RAI, M. K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U.2008a. Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germplasm exchange. **Scientia Horticulture**, v. 118, p. 33–38. 2008.

RAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U.. Alginate encapsulation of nodal segments of guava (*Psidium guajava* L.) for germplasm exchange and distribution. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Oxford, v. 83, p. 569–573. 2008.

RAI, M. K. et al. The encapsulation technology in fruit plants: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 6, p. 671-679, 2009.

REDENBAUGH, K.; et al. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. **In vitro cellular and development Biology – Plant**, Columbia, v. 20, n. 1, p. 256-257, 1986.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Berlin: Springer. 513p. 2008.

RODRIGUES, C. M. et al. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). **Flora**, Jena, v.207, n.4, p. 264-274, 2012.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo-letters**, London, v. 28, n.3, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS Based vitrification and encapsulation- vitrification protocols. In: REED, B. M. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, p. 33-58. 2008.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, n.1, p. 30-33, 1990.

SALUSTIANO, E. S. J. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alphaslapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational New Drugs**, Dordrecht, v.28, p. 139-44, 2010.

SANDOVAL-YUGAR, E.W. et al. Microshoots encapsulation and plant conversion of *Musa* sp. cv. 'Grand Naine'. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.4, p.998-1004, 2009.

SANTOS, F. S. et al. Biometria e qualidade fisiológica de sementes de diferentes matrizes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A. DC.) StandI. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 82, p. 163-173, 2009.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 70-84, 2000. Especial.

SHIBLI, R.A. et al. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, v. 2, n. 4, p. 372–382. 2006.

SILVA, D. G. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia*. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2011

SILVA, T. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In Vitro* Conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under Slow-Growth Conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 384-389, 2011.

SINGH, J.; TIWARI, K.N. High-frequency *in vitro* multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L. – A valuable medicinal plant. **Industrial Crops and Products**. v. 32, p. 534-538. 2010.

SONEJI, J. R. et al. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas Comosus* L. Merr.) **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 10, p. 891-894, 2002.

SOUZA, A. C. **Organogênese e Criopreservação de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. o. Grose**. 2014. 89p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

VOLIS, S.; BLECHER, M. Quasi in situ a bridge between ex situ and in situ conservation of plants. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, p. 2441- 2454, 2010.

VILLALOBOS, V. M.; et al. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. **Biotechnology Advances**, New York, v.9, n. 2, p. 197-215, 1991.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. p. 297-330. 1998.

CAPÍTULO 1: Armazenamento de sementes sintéticas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl)
S. O. Grose.

RESUMO

O *Handroanthus serratifolius* ou ipê amarelo é uma espécie nativa do Cerrado, ambiente amplamente alterado por ações antrópicas. Uma das formas de se conservar espécies que sofrem ameaças como essa, é a conservação *in vitro* de sementes sintéticas bem como seu armazenamento. Objetivou-se avaliar a conservação em curto prazo de ipê amarelo através da produção de sementes sintéticas e seu armazenamento em diferentes temperaturas. Para isso, foi avaliado o efeito de 0,25µM de ANA e BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 µM) em meio WPM na regeneração de segmentos nodais de ipê amarelo durante 30 dias. Feito isso, foi avaliada a constituição das cápsulas das sementes sintéticas através da variação do meio WPM ou WPM/2 e a porcentagem de alginato de sódio (2, 3 e 4%) durante 30 dias. Para o armazenamento de sementes sintéticas foi realizado um pré-tratamento com solução de sacarose nas concentrações de 0, 25, 50 e 75 M de sacarose por 16 horas em agitação. Posteriormente, as sementes foram armazenadas a 8, 15 e 25°C no escuro e foram avaliados a cada 15 dias durante dois meses. Em ambos os experimentos foram avaliados a porcentagem de regeneração, o número de brotos, número de folhas, formação de calos e a oxidação. A maior porcentagem de regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* foi em meio de cultivo WPM com 0,25 µM de ANA e 1,0 µM de BAP com 100% de regeneração. Para as sementes sintéticas de *H. serratifolius* o uso de matriz de alginato de sódio de 3% dissolvida em meio WPM meia força apresentou uma porcentagem de ruptura das cápsulas de 93,3%. O armazenamento de sementes sintéticas ocorreu durante 60 dias, na temperatura de 15°C principalmente com pré-cultivo em meio líquido contendo 0,25M de sacarose sendo a porcentagem de ruptura de 66%. Portanto, a produção de sementes sintéticas de *H. serratifolius* é viável assim como seu armazenamento em curto prazo.

Palavras-chave: Conservação. Ipê amarelo. Unidades encapsuláveis.

ABSTRACT

Handroanthus serratifolius or yellow ipe is a native species of the Cerrado, environment widely disturbed by anthropic actions. One way to conserve threatened species such as this is the production of synthetic seeds as well as their storage. The objective was to evaluate the short-term conservation of yellow ipe through the production of synthetic seeds and their storage at different temperatures. For this, the effect of 0.25 μ M of NAA and BAP (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 μ M) in WPM medium on the regeneration of yellow ipê lateral buds for 30 days. The composition of the synthetic seeds capsules was evaluated through the WPM or WPM/2 medium variation and the percentage of sodium alginate (2, 3 and 4%) for 30 days. For the storage of synthetic seeds, a pre-treatment with sucrose solution at the concentrations of 0, 25, 50 and 75 grams of sucrose was carried out for 16 hours under stirring. Subsequently, the seeds were stored at 8, 15 and 25°C in the dark and were evaluated every 15 days for 2 months. In both experiments, the percentage of regeneration, number of shoots, number of leaves, callus formation and oxidation were evaluated. The best percentage of *H. serratifolius* nodal segment regeneration was in WPM medium with 0.25 μ M NAA and 1.0 μ M BAP with 100% regeneration. For the synthetic seeds of *H. serratifolius*, the use of 3% sodium alginate matrix dissolved in half strength WPM medium showed a percentage of capsule rupture of 93.3%. The storage of synthetic seeds occurred during the 56 days, at the temperature of 15 °C, specially with preculture in a liquid medium containing 0.25M of sucrose and the percentage of rupture of 66%. Therefore, the production of synthetic seeds of *H. serratifolius* is viable as well as its short-term storage.

Keywords: Conservation. Yellow ipe. Encapsulated units.

1 INTRODUÇÃO

O *Handroantus serratifolius*, mais conhecido como ipê amarelo, é uma Bignoniaceae e apresenta grande potencial econômico para fins madeireiros, ornamentais e medicinais. No paisagismo é bastante utilizado na arborização urbana devido a florada amarela exuberante (DOUSSEAU et al., 2008). Já na medicina, há estudos que relacionam a espécie ao tratamento de várias doenças como de Hodgkin, leucemia, lúpus, Parkinson, psoríase, alergias incluindo o câncer (SALUSTIANO et al., 2010). Porém, essa espécie apresenta baixa longevidade de sementes armazenadas naturalmente. Isso se deve a pequena quantidade de reservas encontradas nos cotilédones de espécies que pertencem a esse gênero. Além disso, grande parte da sua composição química, entre 20 e 30%, é constituída de óleo (DEGAN et al., 1997), e sementes que tem essa característica tendem a perder a viabilidade mais facilmente que as ricas em proteínas e carboidratos, por causa da maior instabilidade química dos lipídios (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Dessa forma, é de extrema importância o desenvolvimento de protocolos que visem propagar e conservar, de forma eficiente, essa espécie.

Dentre as diferentes formas de propagação, o cultivo *in vitro* é uma forma de propagar espécies que se encontram em ambientes alterados antropicamente (como por exemplo, o Cerrado) ou que possuam dificuldades de germinar de forma convencional, além de permitir a produção em larga escala e a inclusão dessas espécies em bancos de germoplasma, aumentando também a facilidade de troca de material genético (PINHAL et al., 2011).

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro* podemos destacar a produção de sementes sintéticas ou unidades encapsuláveis. Essa técnica consiste no encapsulamento de diferentes tipos de explantes como embriões somáticos (denominada semente sintética), ápices caulinares e segmentos nodais (denominadas unidades encapsuladas) em uma matriz de alginato sendo uma alternativa eficiente de propagação e preservação de germoplasma (HUNG; TRUEMAN, 2012; MISHRA et al., 2011). Além disso, a produção de sementes sintéticas permite a troca de germoplasma de forma segura e eficiente (GERMANA et al., 2011; HUNG; TRUEMAN, 2012).

Geralmente, utiliza-se uma matriz de alginato de sódio para a formação da cápsula, isso porque esse composto apresenta diversas vantagens como boa solubilidade em temperatura ambiente, boa propriedade geleificante, baixo custo, fácil manipulação e atóxico para as plantas e para o homem (PEREIRA et al., 2008). Contudo, apesar de já terem sido obtidos diversos resultados promissores da aplicação dessa técnica (BUSTAN et al., 2013;

HUNG; TRUEMAN, 2012; RIHAN et al., 2012), o tipo de explante e os constituintes da cápsula precisam ainda ser amplamente investigados (GUEDES; COSTA; PEREIRA, 2007; PEREIRA et al., 2008). As necessidades nutricionais, compostos orgânicos e inorgânicos, são espécie-específico e por isso, cada espécie de interesse deve ter estudos individuais visando buscar o melhor protocolo de produção e armazenamento de sementes sintéticas.

Dessa forma, objetivou-se desenvolver um protocolo eficiente de encapsulamento de segmentos nodais de *H. serratifolius*, bem como o armazenamento dessas sementes sintéticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, na Universidade Federal de Lavras, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Lavras – MG.

2.1 Obtenção do material vegetal

As sementes de *H. serratifolius* foram coletadas após a dispersão entre os meses de setembro a dezembro, no Campus universitário da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras – MG, Brasil localizado a 21° 14' 43 S, 44° 59' 59 W.

As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar por imersão em álcool etílico 70% durante 30 segundos e em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) durante 10 minutos, seguida de lavagem em água destilada e autoclavada. Posteriormente o tegumento foi retirado com o auxílio de pinças de ponta fina (SOUZA et al., 2014).

A seguir, os embriões zigóticos foram imersos em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), lavados três vezes em água destilada e autoclavada e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1,44 μM de ácido giberélico (GA3), 30 g L^{-1} de sacarose e geleificado com 7 g L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121°C por 20 minutos (ABBADE; PAIVA; PAIVA, 2010).

Após os 30 dias de germinação, foram iniciados os ciclos de multiplicação, sendo excisados segmentos nodais e multiplicados em meio WPM, *Wood Plant Medium*, (LLOYD; MCCOWN, 1981) suplementado com 2,0 μM de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L^{-1} de sacarose e geleificado com 7g L^{-1} de ágar (SOUZA et al., 2014). Foram realizados subcultivos a cada 30 dias.

As plântulas estabelecidas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C com irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2 Armazenamento de sementes sintéticas

2.2.1 Desenvolvimento de segmentos nodais

Para a regeneração de brotações, segmentos nodais com aproximadamente 2 mm foram excisadas de plântulas estabelecidas *in vitro* e inoculadas em placas de petri com meio de cultivo WPM, acrescido com 0,09 M de sacarose, gelificado com 7 g L^{-1} de ágar, e suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e $8,0 \mu\text{M}$) acrescido com $0,25 \mu\text{M}$ de ácido naftaleno acético (ANA) (SOUZA, et al. 2014). Os explantes foram mantidos na ausência de luz por uma semana, para evitar a oxidação dos tecidos lesionados e após esse período as placas foram transferidas para um fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 2 °C. As variáveis avaliadas após 30 dias de cultivo *in vitro* foram a porcentagem de regeneração dos segmentos nodais (%), número de brotos, porcentagem de oxidação e formação de calos (%).

2.2.2 Constituição da matriz de encapsulamento e porcentagem de alginato

Segmentos nodais (2 mm de comprimento) foram isolados de plântulas de *H. serratifolius* cultivadas *in vitro* e adicionados a matriz de alginato de sódio (Sigma-Aldrich) variando-se a porcentagem em 2, 3 e 4% (p/v) dissolvidas em meio WPM ou WPM com metade das concentrações dos seus sais (WPM/2). Em seguida, com o auxílio de pipeta automática e ponteiros autoclavados, os segmentos foram resgatados individualmente e gotejados em solução de cloreto de cálcio (100 mM) na qual permaneceram por 20 minutos (período de complexação). Após a fase de complexação, as cápsulas foram imersas em água destilada e autoclavada para retirada do excesso de cloreto de cálcio. As cápsulas em seguida, foram descomplexadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) por 15 minutos. As cápsulas foram então inoculadas em meio de regeneração de segmentos (RS) constituído de meio WPM acrescido da melhor concentração de BAP obtida no experimento anterior, 3% de sacarose e 0,7% de ágar. O controle foi composto por segmentos nodais não encapsulados.

Após 30 dias foram avaliados a porcentagem de regeneração dos segmentos nodais (%), o número de folhas por brotação, número de brotos, formação de calos e oxidação (%).

2.2.3 Armazenamento de sementes sintéticas

Segmentos nodais (2 mm) foram excisados a partir de cultivos *in vitro* de *H. serratifolius* e passaram pelo processo de encapsulamento usando os melhores resultados apresentados no passo anterior. Cápsulas (controle positivo) foram descomplexadas em nitrato de potássio (100 mM) e colocadas em meio RS. As cápsulas restantes passaram então por uma desidratação (pré-cultivo) em meio líquido com diferentes concentrações de sacarose (0,25 M; 0,50 M e 0,75 M) durante 16 horas em mesa agitadora a uma temperatura de 25°C.

As cápsulas foram colocadas em criotubos estéreis e então foram armazenadas nas temperaturas de 8, 15 e 25°C, permanecendo no escuro durante os períodos de 15, 30, 45 e 60 dias. Após cada período de armazenamento, as cápsulas passaram pela descomplexação e foram colocadas em meio RS. Após 30 dias, foram avaliadas a porcentagem de regeneração(%), de formação de calos(%), de oxidação(%) e o número de brotos. Foram também inoculados segmentos nodais sem passar pelo processo de encapsulamento (controle negativo), sendo que segmentos foram imediatamente inoculados em meio RS após a excisão.

2.5 Estatística

Foram realizadas 15 repetições para cada tratamento em todos os experimentos realizados.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011) comparando as médias pelo teste de Scott Knott com probabilidade de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento de segmentos nodais

De maneira geral, os segmentos nodais de *H. serratifolius*, após o período de 30 dias de cultivo apresentaram formação de brotos e calos com exceção dos segmentos que oxidaram (Figura 1).

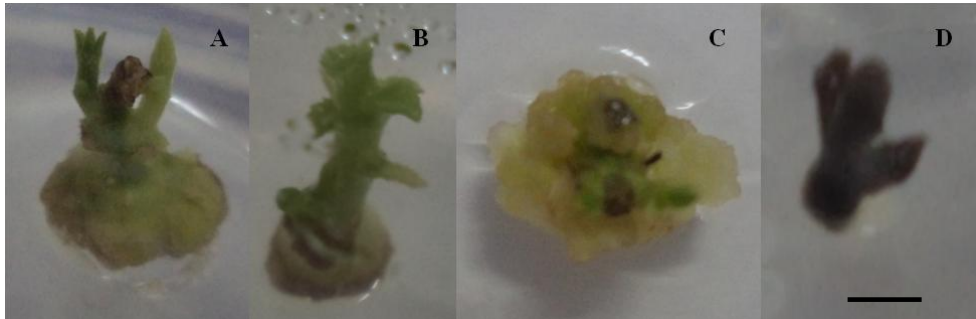


Figura 1 - Segmentos nodais de *H. serratifolius* após 30 dias de cultivo em meio WPM com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 μM) e 0,25 μM de ANA. Regeneração das segmentos nodais com formação de novos brotos (A e B). Formação de calos (C). Segmento nodal oxidado (D). Barra = 15mm.

As segmentos nodais que foram inoculadas em meio de cultivo WPM acrescido das concentrações de 1 ou 4 μM de BAP e 0,25 μM de ANA apresentaram as maiores porcentagens de regeneração, 100 e 93,33%, respectivamente, não diferindo significativamente entre si aos 30 dia de cultivo (Figura 2).

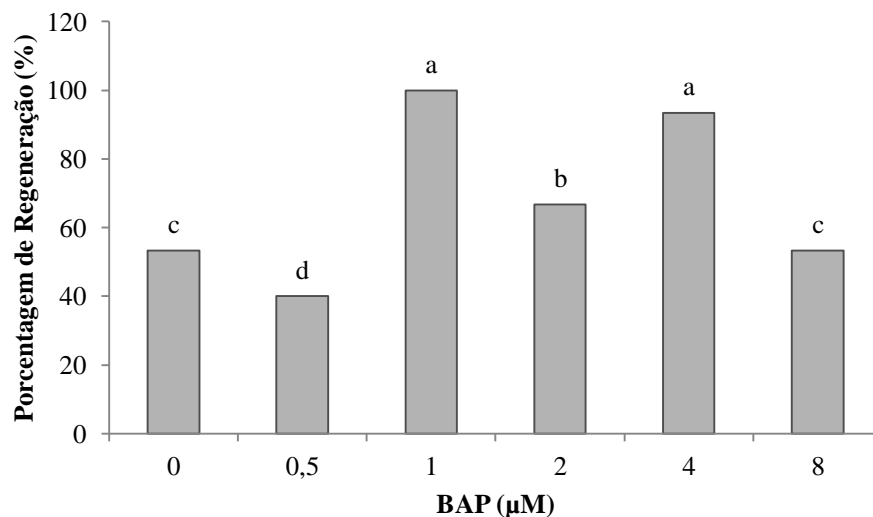


Figura 2 - Porcentagem de regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* em meio de cultivo WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 μM) combinados com 0,25 μM de ANA aos 30 dias de cultivo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Em relação ao número de brotos, as concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 μM de BAP apresentaram maior média do número de brotos, 1,93, 1,20 e 1,27 respectivamente não sendo observada diferença significativa entre essas concentrações (Figura 3).

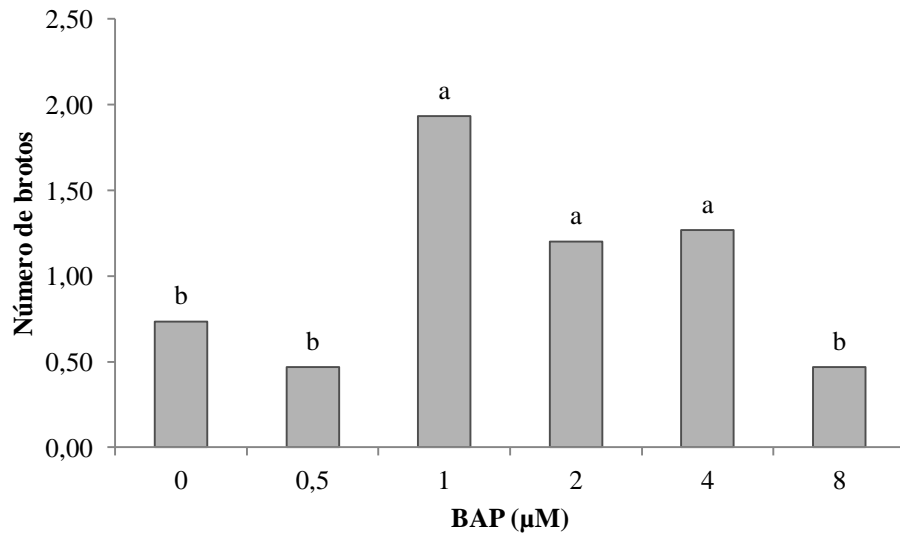


Figura 3 - Média do número de brotos provenientes de segmentos nodais de *H. serratifolius* em meio de cultivo WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM) combinados com 0,25 µM de ANA aos 30 dias de cultivo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Observou-se a formação de calos em 100% dos segmentos nodais inoculadas em meio de cultivo WPM contendo somente 0,25µM de ANA, sendo este a maior porcentagem de formação de calos apresentada em relação aos demais meios de cultivo com a adição da citocinina BAP. A menor formação de calo por sua vez, ocorreu na concentração de 8 µM de BAP, representando em torno de 20%. (Figura 4).

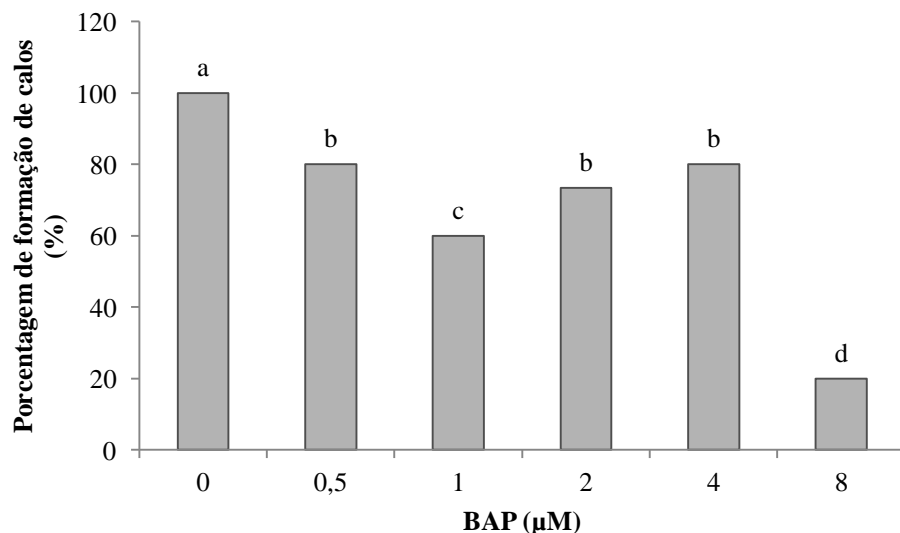


Figura 4 - Porcentagem da formação de calos em segmentos nodais de *H. serratifolius* em meio de cultivo WPA suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM) combinados com 0,25 µM de ANA aos 30 dias de cultivo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Para o número de folhas, notou-se um maior número nos meios que continham 1,0 e 4,0 μM de BAP, não diferindo entre si, com média de 4,27 folhas em ambas as concentrações (Figura 5).

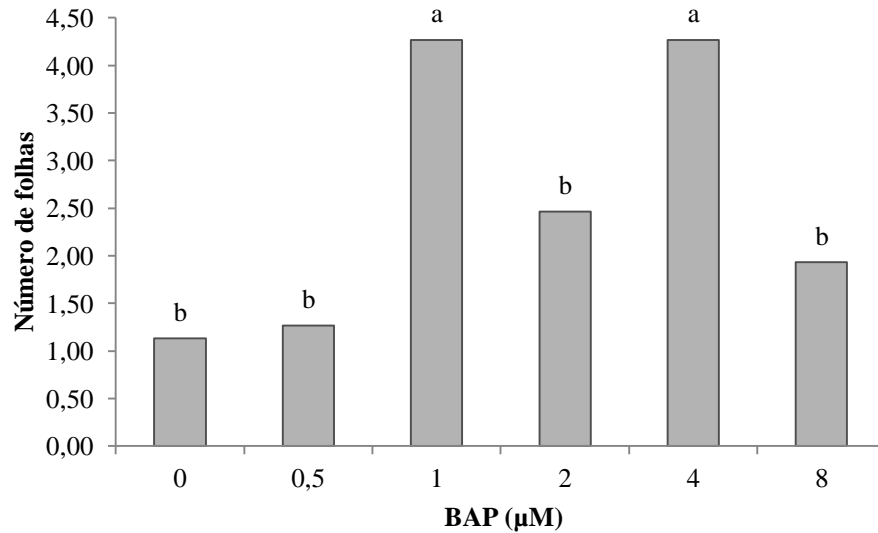


Figura 5 - Média do número de folhas em brotos provenientes de segmentos nodais de *H. serratifolius* em meio de cultivo WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 μM) combinados com 0,25 μM de ANA aos 30 dias de cultivo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Já para a porcentagem de oxidação, não foi observado na ausência de BAP bem nas concentrações de 1,0 e 4,0 μM de BAP utilizadas. Contudo, na maior concentração desse regulador, 8,0 μM , ocorreu a maior porcentagem de oxidação desses explantes de 60% (Figura 6).

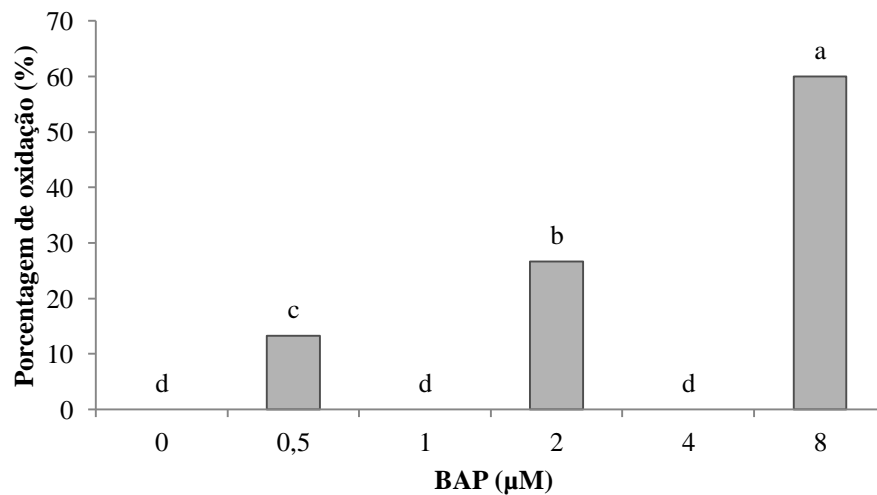


Figura 6 - Porcentagem de oxidação em segmentos nodais de *H. serratifolius* em meio de cultivo WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM) combinados com 0,25 µM de ANA aos 30 dias de cultivo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

A citocinina mais empregada na regeneração de brotos e em sua multiplicação tem sido o BAP (ARAGÃO et al., 2011). Mas é necessária a determinação da concentração ótima a ser utilizada de acordo com cada explante e espécie estudada.

O uso combinado de auxinas e citocininas pode ser responsável pelo incremento no número de brotos, uma vez que faz com que a divisão das células ocorra em maior quantidade, principalmente se a combinação for de baixas concentrações de auxinas com altas de citocininas (CHENG et al., 2013).

Contudo, as auxinas estão intimamente ligadas a formação de calos em explantes cultivados *in vitro*, justamente por promover um incremento na divisão, o que dá origem à uma massa celular com crescimento desordenado (GEORGE et al., 2008). Como notado no presente trabalho, o uso de ANA na ausência de BAP, foi responsável pela maior formação de calos nos explantes (Figura 4). Silva et al., (2010), obtiveram crescimento de 60% de ápices de *Ceiba pentandra* quando usado 9,7 µM de BAP. Para *H. serratifolius*, um maior crescimento das brotações foi obtido com o uso de 2µM de BAP no cultivo de ápices caulinares (SOUZA, 2014). Para entrenós de macieira, a concentração de 1,0mg L⁻¹ foi responsável pela maior taxa de regeneração (SCHUCH et al, 2012).

Na maior concentração de citocinina utilizada, houve uma menor formação de brotos. Isso pode ter ocorrido devido a um balanço hormonal desfavorável pelo uso da concentração elevada de BAP no meio de cultivo, desfavorecendo assim a formação de brotações, uma vez que isso é fortemente dependente da relação entre citocininas e auxinas (GEORGE, 2008).

Para o número de folhas, observou-se um resultado já esperado, uma vez que nas mesmas concentrações em que a média de folhas foi maior, foram também encontradas a maior porcentagem de regeneração e o maior número de brotos formados.

A maior porcentagem de oxidação obtida nesse trabalho, em torno de 60% de segmentos nodais com 8 μ M de BAP, pode estar relacionada ao efeito citotóxico que as citocininas podem desempenhar quando utilizadas em altas concentrações (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De maneira geral, houve uma maior porcentagem de regeneração e de formação de novos brotos nas concentrações medianas utilizadas (1,0; 2,0; 4,0 μ M) de BAP. E conseqüentemente, o maior número de folhas também foi encontrado nessas concentrações.

3.2 Constituição da matriz de encapsulamento e porcentagem de alginato de sódio

Aos 30 dias, para a ruptura de cápsulas (Figura 7), observou-se uma maior porcentagem nas concentrações de 2 e 3% de alginato de sódio em ambos os meios de cultivo (Tabela 1). Para a porcentagem de formação de calos, resultados semelhantes aos da ruptura foram observados.

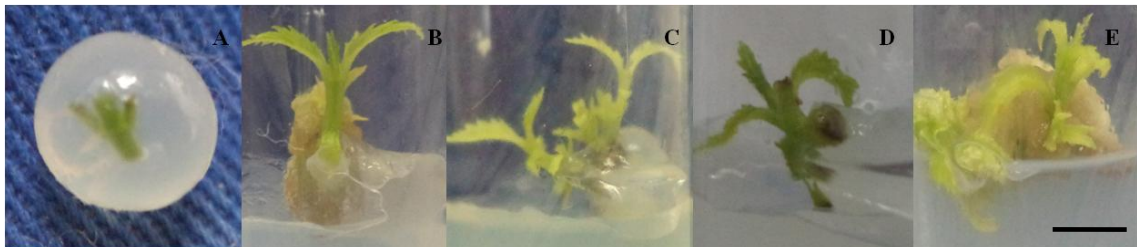


Figura - 7 Sementes sintéticas de segmentos nodais de *H. serratifolius* (A). Cápsulas rompidas com formação de brotos nas concentrações de 2% (B), 3% (C) e 4% (D) de alginato de sódio. Evidência da formação de calos em brotos após a ruptura da cápsula (E). Barra = 0,5 cm.

Tabela 1 - Número de folhas e porcentagem de ruptura, oxidação e formação de calos de sementes sintéticas de *H. serratifolius*, em diferentes meios de cultivo com diferentes concentrações de porcentagem.

Alginato (%)	WPM/2		WPM		WPM/2		WPM	
	Ruptura (%)		Calos (%)		Oxidação (%)		Nº de brotos	
2	86,6aA	80,0aA	80,0aA	80,0aA	13,3aB	0,00aB	0,80aA	1,07aA
3	93,3aA	60,0bA	86,6aA	40,0bB	0,00aB	26,6aB	1,13aA	1,00aA
4	53,3aB	26,6aB	26,6aB	6,60aC	40,0aB	66,6aA	0,60aA	0,40aB

* Letras minúsculas entre colunas e letras maiúsculas entre linhas

Já em relação à oxidação, não houve explantes com essa característica nas concentrações de 3 e 2% nos meios de cultivo com meio WPM meia força de sais e com força total respectivamente. A maior oxidação ocorreu com 4% de alginato de sódio no meio de cultivo WPM (66,6%).

A média do número de brotos formados no meio de cultivo WPM meia força, não diferiu significativamente entre as concentrações de alginato de sódio. Porém, para o meio WPM força total, as porcentagens de alginato de sódio de 2 e 3% obtiveram maior número médio de brotos formados (1,07 e 1,00 respectivamente).

Já para as concentrações de alginato de sódio, em relação à porcentagem de ruptura, notou-se diferença significativa entre os meios de cultivo, apenas na concentração de 3%, onde o meio WPM/2 apresentou 93,3% de ruptura de cápsulas.

Para a variável porcentagem de oxidação, não houve diferença significativa para nenhuma das concentrações de alginato de sódio utilizadas entre os meios de cultivo.

Em relação à porcentagem de formação de calos, a concentração de 3% de alginato no meio de cultivo WPM/2 apresentou 86,6% de calos formados.

Para o número de brotos, também não houve diferença significativa entre os meios de cultivo para nenhuma das concentrações de alginato de sódio.

Uma matriz de 3 % de alginato de sódio apresenta formação firme, clara e cápsulas isodiamétricas. Já as cápsulas formados por 2 % de alginato de sódio são consideradas mais frágeis e com formato irregular, enquanto que em maior concentração de alginato de sódio (4%), as esferas apesar de serem isodiamétricas, eram duras o suficiente para causar um atraso considerável na emergência da parte aérea, o que pode ser corroborado por Rai; Jaiswal; Jaiswal (2008). Observações semelhantes também foram feitas em *Solanum tuberosum* (SARKAR; NAIK , 1997) , *Punica granatum* L. (NAIK; CHAND, 2006), *Phyllanthus amarus* (SINGH et al ., 2006a) e *somnifera* (SINGH et al ., 2006b) . Estes autores corroboram com os aspectos e resultados encontrados neste trabalho.

Também deve ser considerado que ao aumentar a concentração de alginato de sódio, a cápsula se torna mais impermeável, podendo restringir assim, não só a absorção de nutrientes e de água para a retomada do crescimento do explante, como também dificultar sua respiração. Além disso, o acúmulo de polifenóis e produtos da oxidação, provenientes dos tecidos lesionados no momento da excisão do explante (ERIG; SCHUCH, 2003; SATO et al., 2001; HUANG et al., 2002), podem ter influenciado para a maior oxidação dos explantes neste trabalho, já que as cápsulas com 4% de alginato de sódio são mais firmes e impedem a translocação dos mesmos para o meio de cultivo.

Em relação às soluções de sais que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE et al., 2008). Altas concentrações do meio básico do MS, por exemplo, podem ser tóxicas para o crescimento da raiz ou um efeito osmótico para sementes de atoveran (*Ocimum selloi*) *in vitro* (MONFORT et al., 2015).

O uso de meios com concentrações salinas menores, proporciona menor pressão osmótica que a de um meio rico em nutrientes, favorecendo assim a absorção de água (MONFORT et al., 2015).

Segundo Pinhal et al., 2011 os nutrientes influenciam o balanço osmótico e, conseqüentemente, o desenvolvimento do material. Dessa forma, concentração dos componentes do meio é objeto de estudo uma vez que varia com a espécie, explante e tipo de técnica utilizados.

A qualidade das sementes sintéticas está diretamente relacionada com a constituição da matriz de encapsulamento, quantidade e disponibilidade de nutrientes (SHARMA; SHAHZAD; SILVA, 2013). Para sementes sintéticas de mangabeira, a maior taxa de regeneração de gemas apicais foi de 90% em meio WPM força total (NOGUEIRA et al, 2011). Pereira et al. (2008), o MS com força total e 3/4 , resultaram 100 e 75% de rompimento de cápsula de sementes pré-germinadas de pimenta longa. Já para embriões encapsulados de mamão, o meio constituinte das cápsulas contendo 1/2 MS, apresentou 77,5% de germinação (CASTILLO et al, 1998).

3.3 Armazenamento de sementes sintéticas

Tanto os segmentos nodais que não foram encapsulados, quanto os que foram, mas que não passaram por nenhuma concentração de sacarose para que houvesse a desidratação, apresentaram 100% de regeneração após 30 dias de cultivo.

Notou-se de maneira geral que a porcentagem de ruptura (Figura 8) diminuiu com o passar do tempo de armazenamento sendo que aos 60 dias foram observadas rupturas apenas nas temperaturas de 8°C e 15°C nas concentrações de 0 e 25 gramas de sacarose. A maior porcentagem de ruptura foi de 66% aos 15°C com o pré cultivo de 25 gramas de sacarose.

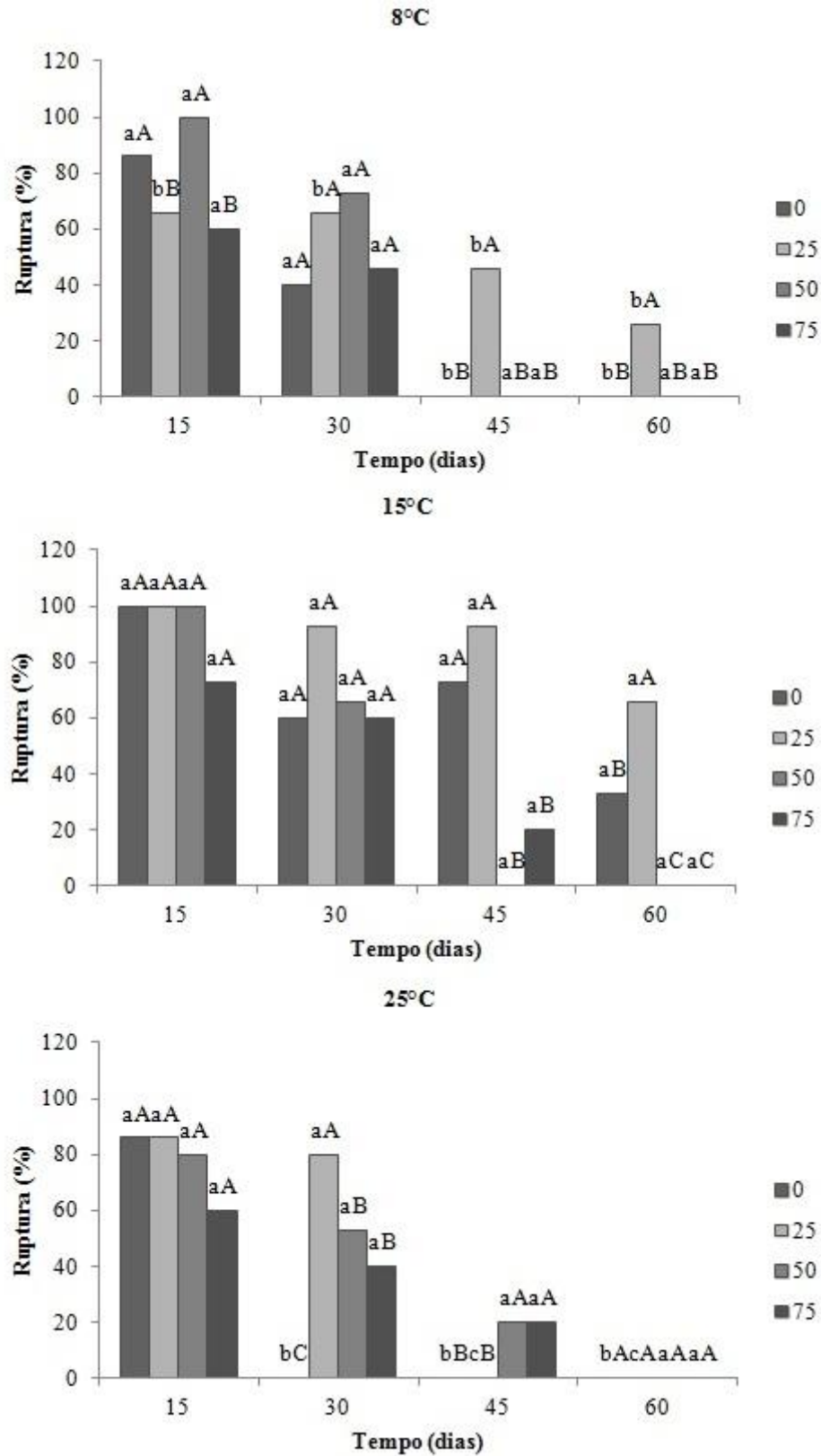


Figura -8 Porcentagem de ruptura de sementes sintéticas de *H. serratifolius* nas temperaturas de 8, 15 e 25°C nos diferentes tempos de armazenamento, 15, 30, 45 e 60 dias, após o pré cultivo das mesmas em diferentes concentrações de sacarose, 0, 25, 50e 75 M. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Já para a formação de calos (Figura 9), similar a ruptura, notou-se uma diminuição da formação com o tempo de armazenamento. Contudo, essa formação foi condizente com o número de sementes sintéticas rompidas. Sendo assim, observou-se uma grande porcentagem de formação de calos nos explantes que sobreviveram ao armazenamento. Aos 60 dias, assim como ruptura, a maior porcentagem foi encontrada aos 15°C com pré cultivo de 25 gramas de sacarose, sendo também de 66% ou seja, todas as sementes sintéticas que romperam suas cápsulas, apresentaram desenvolvimento de calos.

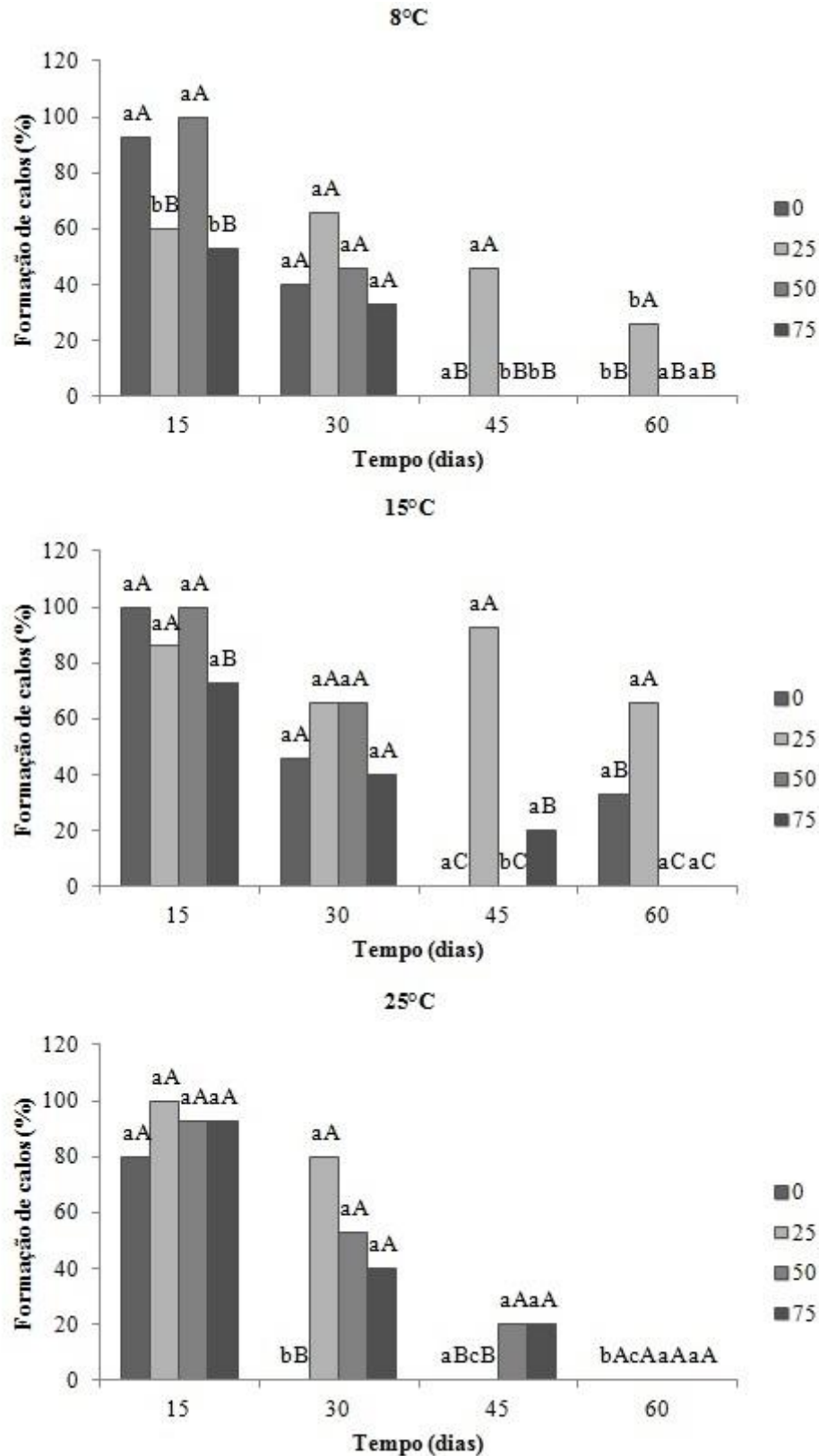


Figura -9 Porcentagem de formação de calos em sementes sintéticas de *H. serratifolius* nas temperaturas de 8, 15 e 25°C nos diferentes tempos de armazenamento, 15, 30, 45 e 60 dias, após o pré cultivo das mesmas em diferentes concentrações de sacarose, 0, 25, 50 e 75 M. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Assim como para as outras variáveis, o número médio de brotos (Figura 10) diminuiu com o tempo de armazenamento uma vez que a ruptura se tornou menor e conseqüentemente o desenvolvimento dos segmentos nodais também. Foi observado então, que para as temperaturas de 8 e 15° houve formação de brotos apenas nas concentrações de 0 e 25 gramas de sacarose, destacando que a maior média ocorreu aos 15°C com o pré cultivo com 25 gramas desse osmorregulador sendo de 0,86.

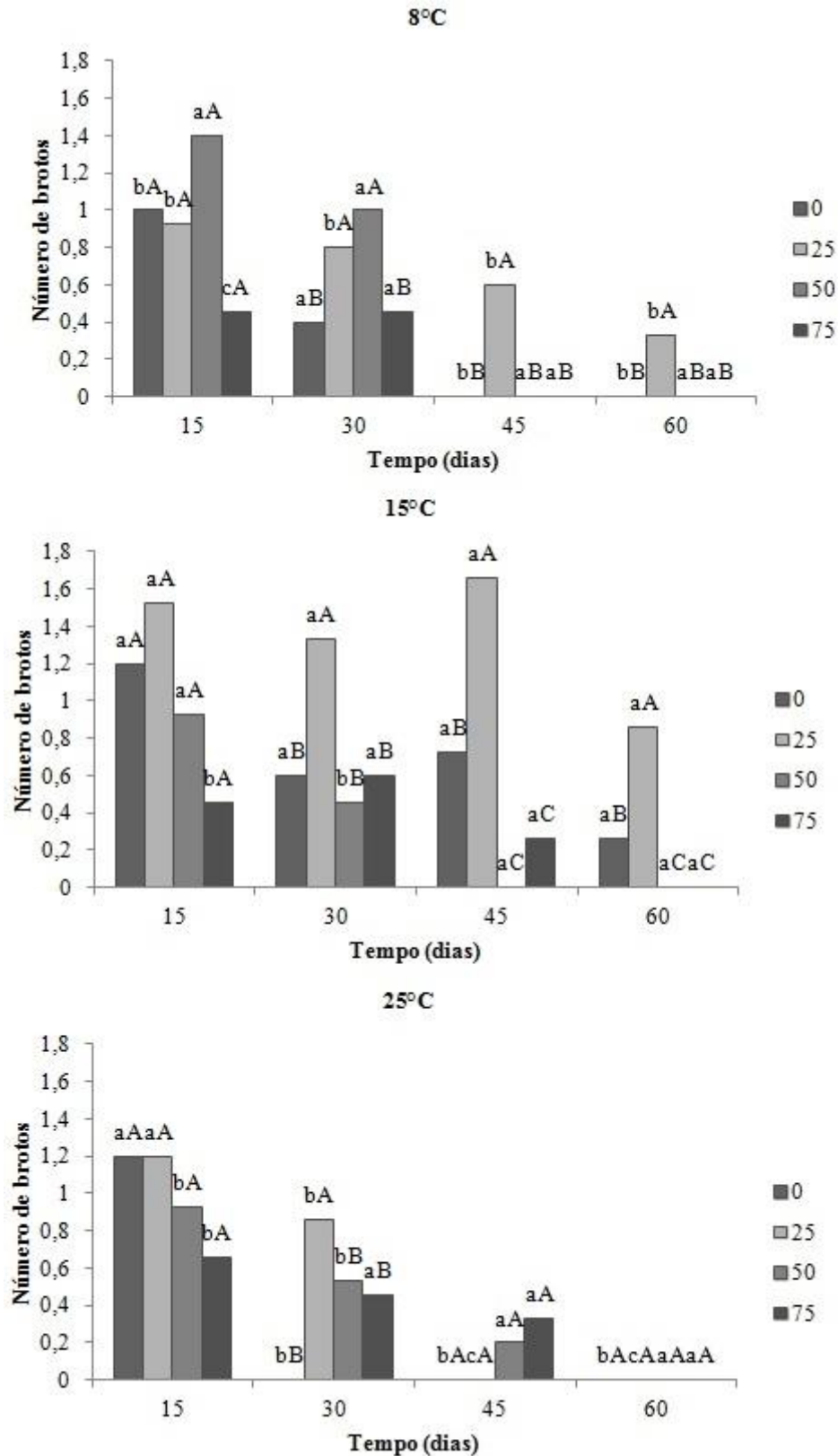


Figura -10 Número médio de brotos em sementes sintéticas de *H. serratifolius* nas temperaturas de 8, 15 e 25°C nos diferentes tempos de armazenamento, 15, 30, 45 e 60 dias, após o pré cultivo das mesmas em diferentes concentrações de sacarose, 0, 25, 50 e 75 M. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Para o número médio de folhas, observou-se também a diminuição com o tempo de armazenamento. Com exceção da maior temperatura, o pré cultivo com 25 gramas de sacarose apresentou as maiores médias dessa variável, coincidindo com a porcentagem de ruptura e a formação de novos brotos. Dessa forma, no fim dos 60 dias, esse pré cultivo apresentou novas folhas nas temperaturas de 8 e 15°C. Porém, aos 15°C foi observado a maior média do número de folhas de 1,53.

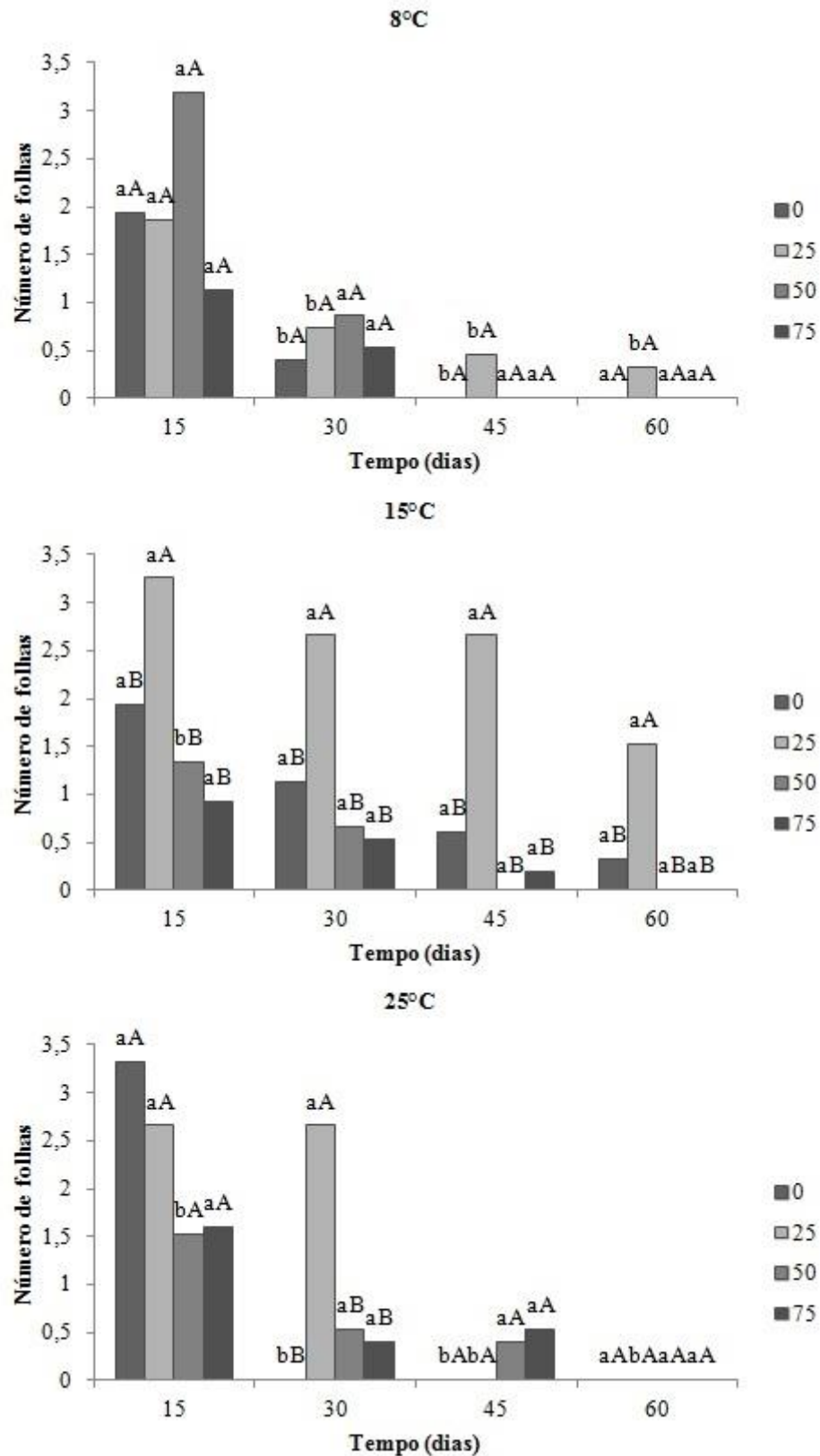


Figura-11 Número médio de folhas em sementes sintéticas de *H. serratifolius* nas temperaturas de 8, 15 e 25°C nos diferentes tempos de armazenamento, 15, 30, 45 e 60 dias, após o pré cultivo das mesmas em diferentes concentrações de sacarose, 0, 25, 50 e 75 M. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Para a oxidação, o contrário aconteceu sendo que as maiores porcentagens aconteceram com maiores períodos de armazenamento. Notou-se que de maneira geral o pré cultivo com 25 gramas de sacarose diminuiu essa porcentagem fazendo com que aos 60 dias a menor oxidação ocorresse aos 15°C sendo de 33%.

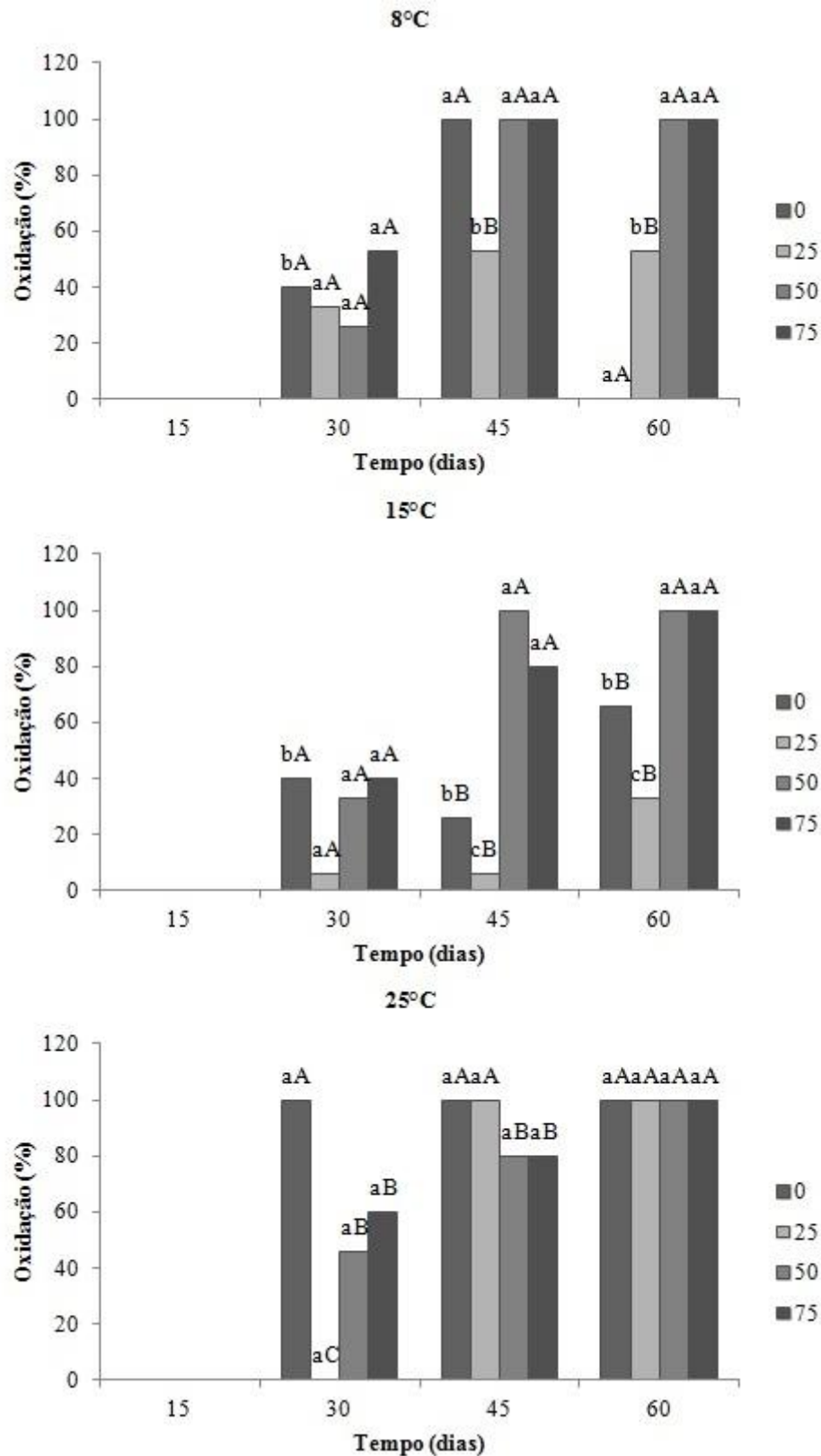


Figura -12 Porcentagem de oxidação em sementes sintéticas de *H. serratifolius* nas temperaturas de 8, 15 e 25°C nos diferentes tempos de armazenamento, 15, 30, 45 e 60 dias, após o pré cultivo das mesmas em diferentes concentrações de sacarose, 0, 25, 50 e 75 M. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Os resultados encontrados demonstraram que, de uma forma geral, os segmentos nodais podem ser armazenados por 60 dias, principalmente com pré-cultivo na concentração de sacarose de 25 gramas nas temperaturas mais baixas. As SS apresentaram ruptura e desenvolvimento normal além apresentarem menor porcentagem de oxidação. Contudo, a formação de calos ocorreu em grande parte dos explantes acompanhando a porcentagem de ruptura das SS (Figura 13).

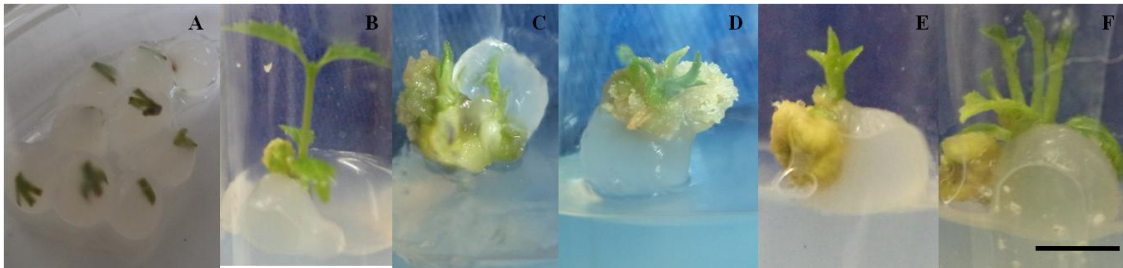


Figura-13 Sementes sintéticas de segmentos nodais de *H. serratifolius* após os períodos de armazenamento. Aspecto geral das sementes sintéticas logo após a retirada da B.O.D (A). Aspecto das sementes sintéticas após 30 dias de cultivo em meio WPM com 1,0µM de BAP + 0,25µM de ANA: ruptura da cápsula e formação de brotos (B-F), calos formados (C-F). Barra = 1cm.

Neste trabalho notou-se que explantes mesmo após os 60 dias de armazenamento, conseguiram sobreviver e se desenvolver posteriormente. Isso pode ser porque, a cápsula de alginato de sódio formada pelo contato com o cloreto de cálcio, oferece resistência e proteção ao propágulo para sua manipulação e transporte, como também pode garantir a viabilidade do mesmo através do seu enriquecimento com nutrientes (PINTOS et al., 2008).

Para gengibre, a conversão de 53% microbrotos foi alcançada a partir de sementes sintéticas após armazenamento de 56 dias após pré cultivo das unidades em 0,25 M à 25°C (SUNDARARAJ; AGRAWAL; TYAGI, 2010). Similar ocorreu neste trabalho, onde 66% de sementes sintéticas regeneraram após 8 semanas após a desidratação por sacarose 0,25M por 16 horas à 25°C, porém, diferentemente, aos 15°C.

Infere-se que, o tempo de armazenamento na temperatura de 15°C e com pré desidratação das unidades com 0,25M, possa ser maior do que o testado no presente estudo. Para gengibre, 12 semanas promoveram ruptura de 13% de cápsulas armazenadas à 25°C nas com essa concentração de sacarose (SUNDARARAJ; AGRAWAL; TYAGI, 2010). Uma alternativa para aumentar o tempo de armazenamento seria o uso de placas contendo meio de

cultivo, como feito por Hung; Trueman (2012) em espécies de Myrtaceae e Meliaceae à 10-14°C.

Além disso, ao contrário do observado neste estudo, as concentrações de 0,5 e 0,75M de sacarose, não proporcionaram nenhuma regeneração em brotos após o armazenamento em gengibre (SUNDARARAJ; AGRAWAL; TYAGI, 2010). Foi observado em todas as temperaturas, regeneração até os 30 dias. Somente aos 45 essa regeneração diminuiu (20%) sendo observada principalmente aos 25°C, nas concentrações mais elevadas de sacarose.

Essa diminuição pode ter sido devido a alta concentração de sacarose a qual as cápsulas foram expostas previamente. Melo et al. (2011), por exemplo, em estudos com cana de açúcar, concluíram que altas concentrações de sacarose podem resultar em choque osmótico, o que explicaria a diminuição das taxas de conversão dos segmentos nodais encapsulados pré-cultivados em meio MS líquido com 0,5 e 0,75 M de sacarose aos 30 dias de armazenamento na maior temperatura.

Contudo, é notável a importância do pré-cultivo com sacarose, mesmo que em uma menor concentração de 0,25M, para o aumento do tempo de armazenamento dos explantes em cápsulas mantendo sua viabilidade. Semelhante ocorreu para *Mandevilla moricandiana*, onde uma conversão de 33% de segmentos nodais encapsulados armazenadas à 15°C por 30 dias ocorreu. Porém, essa conversão não ocorreu em nenhum momento para as outras temperaturas testadas (4 e 25°C) e também para a de 25°C aos 60 dias. Quando tratados antes do armazenamento, com 0,4 M de sacarose por 2 ou 7 dias, as cápsulas obtiveram 26,6 e 33 % de regeneração aos 30 dias à 4°C. E aos 60 dias, esses valores caíram para 3,33 e 6,66% respectivamente (CORDEIRO et al., 2014). Os resultados encontrados por esses autores corroboram os encontrados neste trabalho, mostrando que o emprego da sacarose no pré-cultivo, dependendo da concentração, é benéfico para o armazenamento.

A concentração favorável ao armazenamento de SS de ipê amarelo foi de 0,25 M de sacarose durante 16 horas, responsável assim, por fornecer os nutrientes necessários para que as cápsulas tivessem melhor regeneração após o armazenamento como tem sido observado também em outros trabalhos (BAPAT; RAO, 1992; NIEVES et al., 1998; SUNDARARAJ; AGRAWAL; TYAGI, 2010).

Além disso, o acúmulo de açúcar nos tecidos é uma estratégia conhecida entre as plantas para tolerar o stress, incluindo desidratação, através da estabilização de proteínas e membrana com bicamada lipídica (ZHU et al., 2006). A técnica de produção de sementes sintéticas viáveis em termos de germinação ou crescimento potencial, mesmo após um

considerável período de armazenamento é desejável para fins de intercâmbio de germoplasma (NAIK; CHAND, 2006;. MICHELI et al, 2007).

Em relação à temperatura, neste trabalho, a menor temperatura utilizada, teve uma menor taxa de regeneração aos 60 dias se comparada com 15°C. Da mesma forma , a frequência de conversão segmentos nodais de romã encapsulados também diminuiu acentuadamente na sequência armazenamento a baixa temperatura (NAIK; CHAND, 2006) .

Isso ocorreu provavelmente porque, para espécies de clima tropical, como é o caso do ipê amarelo, a tolerância a baixas temperaturas é dificultada. Dessa forma, a menor temperatura de armazenamento, 8°C, provavelmente já foi baixa demais para essa espécie impedindo que os explantes permanecessem vivos durante o armazenamento. Segundo Sundararaj; Agrawal e Tyagi, (2010) sementes sintéticas de culturas tropicais e sub-tropicais não são passíveis de armazenamento à menores temperatura.

Nota-se também, de forma geral, uma diminuição para a porcentagem de regeneração das sementes sintéticas de *H. serratifolius* ao longo do tempo de armazenamento. O declínio na recuperação de propágulos vegetativos encapsulados armazenados pode ser devido a deficiências de oxigênio ocasionadas pela cápsula de alginato de cálcio formada em volta do explante (REDENBAUGH et al., 1991) . Contudo, 60 dias são suficientes para o intercâmbio de germoplasma, portanto, este protocolo pode ser usado como um sistema para a troca de germoplasma.

Para o transporte e intercâmbio de germoplasma, as sementes sintéticas podem ser transportadas a temperatura ambiente (25°C) por 15 dias sem o pré cultivo com sacarose e nenhum meio de cultivo, o que facilita essa troca de material genético entre instituições. Além disso, se utilizado o pré cultivo de 0,25M de sacarose, esse tempo aumenta para 30 dias, aumentando ainda mais a viabilidade de transporte de material em temperaturas ambientes.

Vale ressaltar ainda que, esse protocolo poderá também, servir como uma estratégia alternativa de conservação *in vitro* de curto a médio prazo. Isso pode ser mais econômico em termos de espaço, custo e segurança para finalidade intercâmbio de germoplasma. Protocolos assim também são importantes visando métodos de criopreservação à longo prazo de germoplasma utilizando a técnica de encapsulamento-desidratação (SUNDARARAJ; AGRAWAL; TYAGI, 2010).

4 CONCLUSÃO

A melhor porcentagem de regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* foi em meio de cultivo WPM com 0,25 µM de ANA e 1,0 µM de BAP.

Foi possível produzir sementes sintéticas de *H. serratifolius* a partir de segmentos nodais, sendo indicado o uso de matriz de alginato de sódio de 3% dissolvida em meio WPM meia força.

O armazenamento de sementes sintéticas é viável durante 56 dias, na temperatura de 15°C principalmente com pré-cultivo em meio líquido contendo 0,25M de sacarose.

5 REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Germinação de sementes de ipê-branco em diferentes substratos e meios de cultura. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 22, n. 3,4 p. 162-167, 2010.
- ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I.A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, Lavras, v. 7, p. 339–345, 2011.
- BAPAT, V. A.; RAO, P. S. Plantlet regeneration from encapsulated desiccated somatic embryos of forest tree: sandalwood (*Santalum album* L.). **Journal of Plant Biochemistry Biotechnology**, New Delhi, v. 1, p. 109–113, 1992.
- BUSTAM, S. et al. Selection of optimal stage for protocorm-like bodies and production of artificial seeds for direct regeneration on different media and short term storage of *Dendrobium Shavin* White. **Plant Growth Regulation**, v. 69, p. 215-224, 2013.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- CASTILLO, B.; et al. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 17, n. 3, p. 172-176, 1998.
- CHENG, Z.J. et al. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor. **Plant Physiology**, Rockville, v.161, p.240-251, 2013.
- DEGAN, P. et al. Composição química, sanidade, secagem e germinação de sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 41-47, 1997.
- DOUSSEAU, S. et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.

- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.3, p.221-7, 2003.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3^a ed. The Background Springer. v. 1, 709 p. 2008.
- GERMANÁ, M.A. et al. Perspectives of the encapsulation technology in the nursery activity of Citrus. **Caryologia**, Firenze, v. 60, p. 192–197, 2007.
- GRATTAPAGLIA, d.; MACHADO, M> A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ. P. 183-260. 1998.
- GUEDES, R.S.; COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S. Características físicas e nutricionais da matriz de encapsulamento na produção de sementes sintéticas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1005-1011, 2007.
- HUANG, L. et al. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. **In Vitro Cell Development of Biology - Plant**, Wallingford v.38, p.358-365, 2002.
- HUNG, C.D.; TRUEMAN, S.J. Preservation of encapsulated shoot tips and nodes of the tropical hardwoods *Corymbia torelliana*, *C. citriodora* and *Khaya senegalensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 109, n. 2, p. 341-352, mai. 2012.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MICHELI, M.; HAFIZ, I. A.; STANDARDI, A. Encapsulation of *in vitro*-derived explants of olive (*Olea europea* L. cv. Moraiolo). II. Effects of storage on capsule and derived shoot performance. **Scientia Horticulture**, v. 113, p. 286–292. 2007.
- MISHRA, J. et al. Assessment of genetic fidelity of encapsulated microshoots of *Picrorhiza kurrooa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 104, n. 2, p. 181-186, 2011.
- MONFORT, L. E. F. et al. Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atroveran. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n.2, p. 215-223, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.15, p.473-497, 1962.
- NAIK, S. K.; CHAND, P. K., Nutrient–alginate encapsulation of *in vitro* nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange. **Scientia Horticulture**, Mission, v. 108, p. 247–252, 2006.

- NIEVES, N. et al. Artificial endosperm of Cleopatra tangerine zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 54, p.77–83, 1998.
- NOGUEIRA, G. F. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. embryos using different moisture contents. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 908, p.199-202, 2011.
- PEREIRA, J.E.S. et al. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.26, p. 093-096, 2008.
- PINTOS, B. et al. Synthetic seed production from encapsulated somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) and automated growth monitoring. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n.2, p. 217-225, 2008.
- RAI, M. K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U.2008a. Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germplasm exchange. **Scientia Horticulture**, Mission, v. 118, p. 33–38. 2008.
- RAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U.. Alginate encapsulation of nodal segments of guava (*Psidium guajava* L.) for germplasm exchange and distribution. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Oxford, v. 83, p. 569–573. 2008.
- REDENBAUGH, K.; FUJII, J.; SLADE, D.; VISS, P.; KOSSLER, M. Artificial seeds-encapsulated somatic embryos. In: BAJAJ, Y. P. S (ed) **Biotechnology in agriculture and forestry**, vol 17. High-tech and micropropagation I. Springer: New York, p. 395–416, 1991.
- RIHAN, H.Z. et al. Encapsulation of cauliflower (*Brassica oleracea* var botrytis) microshoots as artificial seeds and their conversion and growth in commercial substrates. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 107, n. 2, p. 243-25, 2011.
- SALUSTIANO, E. S. J. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alphalapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational New Drugs**, Dordrecht, v.28, p. 139-44, 2010.
- SARKAR, D.; NAIK, P. S. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification. **Annals of Botany**, Oxford, v.82, p.455-461,1998.
- SATO, A.Y.; et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.
- SCHUCH, M. et al. Explante, citocinina e luz: fatores que afetam a organogênese de porta enxerto de macieira cultivar m-9. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v.11, n.1, p.365-367, 2012.
- SHARMA, S.; SHAHZAD, S.; SILVA, J.A.T. Synseed technology-A complete synthesis. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 31, n. 2, p. 186-207, 2013.

SILVA, P. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). **Scientia Agraria**, Curitiba, n. 11, p. 437-443, 2010.

SINGH, A.K. et al. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn, a medicinally important plant species. **In Vitro Cell Development of Biology - Plant**, Wallingford, v. 42, p. 109–113. 2006.

SINGH, A.K. et al. Regeneration of plants from alginate-encapsulated shoot tips of *Withania somnifera* (L.) Dunal, a medicinally important plant species. *Journal of Plant Physiology*. v. 163, p. 220–223, 2006.

SOUZA, A. C. **Organogênese e Criopreservação de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. o. Grose**. 2014. 89p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SOUZA, A. C. et al. Dehydration and cryopreservation of *Handroanthus serratifolius* embryos. **Acta Horticulturae**, 1039:181-186, 2014.

SUNDARARAJ, S.G.; AGRAWAL, A.; TYAGI, R.K. Encapsulation for in vitro short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. **Scientia Horticulturae**, Mission, v. 125, n. 4 p. 761-766, 2010.

ZHU, G.Y. et al. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. **Physiologia Plantarum**, v. 128, p. 80–94, 2006

CAPÍTULO 2: Crescimento lento e criopreservação de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.
O. Grose.

RESUMO

A espécie arbórea *Handroanthus serratifolius* é encontrada no Cerrado brasileiro sendo bastante utilizada para fins ornamentais, medicinais e madeireiros. Porém, essa espécie apresenta baixa longevidade no armazenamento de suas sementes. Duas técnicas utilizadas na conservação de espécies são o crescimento lento e a criopreservação. Dessa forma, objetivou-se realizar a conservação do ipê amarelo através dessas duas técnicas e avaliar a regeneração desse material após o armazenamento. Para o crescimento lento, segmentos nodais foram inoculados em meio WPM com diferentes concentrações de sacarose (30, 45 e 60 g/L) e colocados a 8 e 15°C durante 6 meses e mensalmente, os segmentos foram subcultivados. Foram avaliados a porcentagem de regeneração, o número de brotos, número de folhas, formação de calos e a oxidação. Para a criopreservação, a *Droplet Vitrification* e a *PVS2 Vitrification* foram testadas sendo que a permanência no PVS2 foi avaliada variando os tempos em (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos) respectivamente. Foram utilizados segmentos nodais. Após 30 dias a porcentagem de regeneração foi avaliada. Para o crescimento lento, os segmentos nodais de *H. serratifolius* foram armazenados por 6 meses à 15°C com sobrevivência de 70% com adição de 60g de sacarose. Nenhum dos explantes regenerou após a exposição aos tempos de PVS2. Já a criopreservação de segmentos nodais de *H. serratifolius* utilizando a *PVS2 Vitrification* apresentou 53,3% de regeneração após exposição à solução vitrificante PVS2 por 15 minutos. Portanto, é viável armazenar segmentos nodais de ipê amarelo em ambas as técnicas em médio e longo prazo.

Palavras-chave: Ipê amarelo. *Vitrification*. Crescimento mínimo.

ABSTRACT

The tree species *Handroanthus serratifolius* is found in the Brazilian Cerrado and is widely used for ornamental, medicinal and logging purposes. However, this species presents low longevity in storage. Two techniques used in species conservation are slow growth and cryopreservation. In this way, the goal here was to carry out the conservation of the yellow ipê through these two techniques and to evaluate the regeneration of this material after storage. For slow growth, nodal segments were inoculated into WPM medium with different concentrations of sucrose (30, 45 and 60 grams) and placed at 8 and 15 °C for 6 months and monthly the segments were subcultured. The percentage of regeneration, number of shoots, number of leaves, callus formation and oxidation were evaluated. For cryopreservation, droplet vitrification and PVS2 vitrification were tested and the permanence time in PVS2 was evaluated by varying the times in (0, 30, 60, 90 and 120 minutes) and (0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 minutes) respectively. Nodal segments were used. After 30 days the regeneration percentage was evaluated. None of the explants were regenerated after exposure to PVS2 times. The cryopreservation of *H. serratifolius* nodal segments using PVS2 vitrification presented 53.3% regeneration after exposure to the PVS2 vitrification solution for 15 minutes. For slow growth, nodal segments of *H. serratifolius* were stored for 6 months at 15 °C with the survival of 70% with the addition of 60g of sucrose. Therefore, it is feasible to store nodal segments of yellow ipê in both techniques in medium and long term.

Keywords: Yellow ipe. Vitrification. Minimal growth.

1 INTRODUÇÃO

Handroanthus serratifolius é uma espécie florestal nativa do cerrado de grande importância em função de suas utilidades econômicas. Apresenta interesse econômico ornamental, madeireiro, e medicinal (DOSSEAU et al., 2008; GONÇALVES, 2013). Em relação à atividade medicinal, por pertencer à família Bignoniaceae, possui vários compostos químicos, porém a classe de constituintes químicos cujo composto majoritário é o lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4 naftalenodiona), (COSTA, 2012). O lapachol é um produto natural, de coloração amarelada e que apresenta atividade anticancerígena (BARBOSA; PEREIRA NETO, 2013), antimalárica, moluscicida, tripanocida, leishmanicida, antipsoriática, antiulcerogênica, analgésica (COSTA, 2012), bactericida, fungicida, antiofídica (DOSSEAU et al., 2008) e anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 1990).

Com o rápido crescimento da população, e conseqüentemente a expansão agropecuária e industrial, as áreas em que o *H. serratifolius* ocorre, estão cada vez mais sujeitas à destruição e fragmentação de hábitat. Isso faz com que a biodiversidade seja afetada, uma vez que afeta a estabilidade de populações nativas, levando à diminuição ou até mesmo à extinção, por perda de diversidade genética (VISOTTO, 2015).

Existem diferentes técnicas que visam a preservação que podem ser empregadas para que essa conservação ocorra por distintos períodos. Dentre elas se destacam o crescimento lento e a criopreservação.

Uma das técnicas que permitem a conservação por um período de tempo médio é o crescimento lento. Essa técnica é viável para espécies que como o *H. serratifolius*, que frequentemente são utilizados na arborização e no paisagismo, por exemplo, por permitirem de forma mais rápida o transplântio para as áreas de interesse, uma vez que são armazenados explantes como segmentos nodais de mais fácil desenvolvimento.

Ela permite aumentar ao máximo os intervalos entre os subcultivos ou estende-os indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plantas (ROCA et al., 1991; MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010). Dentre as principais estratégias para limitar o crescimento das plantas *in vitro* está a redução da temperatura e a intensidade luminosa, (MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010). Dessa forma há uma redução do metabolismo geral das plantas.

Outra técnica bastante empregada, porém de conservação em longo prazo, é a criopreservação através do nitrogênio líquido à -196°C. Essa técnica é importante para conservar espécies de interesse, principalmente as que sofrem algum problema de armazenamento ou que correm risco em seu habitat natural, permitindo a troca de material

genético entre instituições e a criação de bancos de germoplasma que irão permitir a conservação por tempo indeterminado deste material, possibilitando assim, novas pesquisas e a garantia de regeneração do mesmo quando necessário.

Um dos grandes problemas enfrentados nessa técnica é que a alta quantidade de água intracelular que formam cristais de gelo ocasionando lesões de congelamento (REED, 2008). Para evitar este problema, as células devem passar por uma desidratação artificial para que fiquem protegidas dos danos causados pela cristalização da água (ENGELMANN, 2011).

As metodologias que visam essa desidratação, baseiam-se na vitrificação, em que a solidificação dos líquidos ocorre sem que haja a cristalização devido às altas concentrações de crioprotetores (REED, 2008).

Uma das técnicas recentemente desenvolvidas, que tem alcançado grande sucesso e que utiliza o PVS2 (*Plant vitrification solution*) é a *Droplet-Vitrification*. Essa técnica congela os explantes em nitrogênio líquido. O descongelamento é realizado à temperatura ambiente com uso de solução de descarregamento (ENGELMANN, 2011; CHEN et al., 2011).

Para *H. serratifolius*, foi feita a criopreservação de embriões zigóticos através da *Droplet Vitrification* onde Souza, et al. (2014) obtiveram 85% de germinação ao após a imersão em nitrogênio líquido.

Objetivou-se dessa forma, estabelecer um protocolo de armazenamento a médio e longo prazo, utilizando o crescimento lento e a criopreservação de segmentos nodais de *H. serratifolius*, bem como verificar a viabilidade de segmentos nodais após a exposição à altas concentrações de sacarose e baixas temperaturas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, na Universidade Federal de Lavras, Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Lavras – MG.

2.1 Obtenção do material vegetal

As sementes de *H. serratifolius* foram coletadas após a dispersão no Campus universitário da Universidade Federal de Lavras no município de Lavras – MG, Brasil localizado a 21° 14' 43 S, 44° 59' 59 W.

As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar por imersão em álcool etílico 70% durante 30 segundos e em seguida hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) durante 10 minutos e posteriormente o tegumento foi retirado com o auxílio de pinças de ponta fina (SOUZA et al., 2014).

A seguir, os embriões foram imersos em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1,44 μM de ácido giberélico (GA3), 30 g L^{-1} de sacarose e geleificado com 7 g L^{-1} de ágar. O pH será ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121°C por 20 minutos (ABBADE; PAIVA; PAIVA et al., 2010).

Após os 30 dias de germinação, foram iniciados os ciclos de multiplicação, sendo excisados segmentos nodais e multiplicados em meio WPM suplementado com 2,0 μM de BAP (6-benzilaminopurina), 30 g L^{-1} de sacarose e geleificado com 7 g L^{-1} de ágar (SOUZA, 2014). Este procedimento foi repetido a cada 30 dias.

As plântulas estabelecidas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C com irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2 Crescimento lento

Segmentos nodais de *H. serratifolius* de 2 cm de comprimento contendo um par de gemas axilares sem folhas, foram transferidos para frascos contendo 100 mL do meio WPM (LLOYD E MC COWN, 1981) e diferentes concentrações de sacarose (30, 45 e 60 g L^{-1}), geleificado com 7 g L^{-1} de ágar. Após sete dias iniciais em condições ótimas de cultivo (23 ± 2 °C), 16 h fotoperíodo na presença de luz, os frascos foram transferidos para a condição de baixa temperatura. Foram testadas duas temperaturas de armazenamento, 8°C e 15°C na ausência de luz onde foram mantidos por até seis meses. Após 60 dias, a cada 30 dias, 15 amostras (cinco frascos com três segmentos cada) de cada concentração de sacarose foram retiradas da condição de baixa temperatura, e transferidos para um novo meio WPM e então transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C com irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Esse procedimento foi realizado até os 180 dias de armazenamento. Assim que foram retiradas as plântulas foram avaliadas quanto ao: comprimento dos segmentos nodais (cm), o aspecto (verde ou marrom), a formação de calos (%), número de folhas e a formação de raízes (%). Da mesma forma, 30 dias após a

transferência para o meio WPM, eram realizadas as mesmas avaliações descritas anteriormente.

2.2.1 Aclimatização

As plântulas regeneradas provenientes dos diferentes meios de cultivo com sacarose e das diferentes temperaturas do crescimento lento, foram transferidas após 60 dias de subcultivo, para tubetes contendo o substrato comercial Tropstrato[®]. As plantas foram cobertas com sacos plásticos e colocadas em sala de crescimento em temperatura ambiente e densidade de luz de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O saco plástico foi retirado gradativamente cortando, a cada semana, as laterais e posteriormente a parte superior até que ocorresse a retirada total do mesmo. Após um mês, foram avaliados a sobrevivência (%), presença de raiz (%), tamanho (cm) e número de folhas.

2.3 Criopreservação

2.3.1 Droplet Vitrification

Segmentos nodais com aproximadamente 2mm foram pré-cultivados em meio de cultivo WPM acrescido com 0,3 M de sacarose e geleificado 0,07M de ágar por 24 horas na ausência de luz. Em seguida, foram tratados com *Loading Solution* (LS) [2M de glicerol + 0,4 M de sacarose em MS líquido] (MATSUMOTO; SAKAI; YAMADA, 1994) por 20 minutos. Os explantes foram imersão em *Plant vitrification solution 2* (PVS2) [30% de glicerol + 15% etileno glicol + 15% DMSO + 0,4M de sacarose em MS líquido] (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990), a 0 °C, em gotas dispostas em tiras de papel de alumínio (0,5 x 2,0 cm) por 0, 30; 60; 90 e 120 minutos e após cada período de tempo, as tiras de papel alumínio foram imersas em nitrogênio líquido por no mínimo 30 minutos. Após esse período, foram descongelados pela técnica de descongelamento rápido em *Recovery Solution* (RS) [1,2 M sacarose dissolvida em MS líquido] (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) à temperatura ambiente, no qual foram mantidos por 15 minutos. Foram utilizadas 15 segmentos nodais por tratamento.

Após o processo de criopreservação, os segmentos nodais foram inoculados em meio de pós-cultivo WPM (0,3 M de sacarose), geleificado com 0,07 M de ágar e mantidos por 24

horas no escuro e, posteriormente, inoculados em meio de regeneração composto por sais do meio WPM + 0,25 μ M de ANA + 1,0 μ M de BAP. Os segmentos foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 36 μ mol m⁻²s⁻¹ e temperatura de 25 \pm 2 °C. As variáveis avaliadas após 30 dias de cultivo foram: regeneração e de formação de brotações (%).

2.3.2 PVS2 Vitrification

Segmentos nodais com aproximadamente 2mm foram excisados e pré-cultivados por 24 horas em meio WPM com 0,3M sacarose, 0,1M de prolina (PRUDENTE et al., 2014) e geleificada com 7g L⁻¹ de ágar. Decorrido o pré-cultivo, os explantes foram tratados com LS por 20 minutos antes da exposição ao PVS2 (0°C) por 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Os segmentos foram transferidos para criotubos com 1,0 mL de PVS2 e imersos no NL, por pelo menos 30 minutos. O descongelamento foi realizado em banho-maria (40 \pm 2°C) por dois minutos. Após o descongelamento, a PVS2 foi rapidamente removida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e substituída por 1,0 mL de RS à temperatura ambiente durante 15 minutos.

Após o descongelamento, os segmentos nodais foram cultivados por 24h, no escuro, em meio de pós cultivo [WPM com 0,3 M de sacarose, 20 ppm ácido ascórbico, 7 g L⁻¹ ágar de acordo com SOUZA et al. (2014)]. Após esse período, os segmentos nodais foram transferidos para o meio WPM, acrescido de 1,0 μ M BAP e 0,25 μ M de ANA, de acordo com resultados de experimentos anteriores, 7 g L⁻¹ ágar, 20 ppm ácido ascórbico, 0,09M de sacarose e pH de 5,8. Os explantes foram mantidos por mais sete dias no escuro e então transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16h, durante 21 dias de cultivo. Foram utilizadas 15 repetições por tratamento. Foi avaliada a porcentagem (%) de retomada de crescimento dos segmentos nodais.

2.4 Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software estatístico SISVAR® (FERREIRA et al., 2011) comparando as frequências pelo teste de Scott-knott com probabilidade de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento lento

Para o tamanho dos segmentos nodais, observou-se um menor crescimento na temperatura de 8°C (Figura 1). Porém, após 120 dias de armazenamento, os explantes não sobreviveram a essa baixa temperatura. Já para a temperatura de 15°C, o crescimento dos segmentos atingiu seu ápice aos 120 dias ficando em torno de 1 cm. Contudo, até os 180 dias, notou-se que houve um aumento de tamanho entre 0,4 e 0,7 centímetros.

Já após os 30 dias de subcultivo, a temperatura de 15°C mostrou-se eficiente em relação à retomada do crescimento dos segmentos nodais, tendo a maior retomada, 4 cm, aos 120 dias e 60 g/L de sacarose. Porém, mesmo após os 18 dias de armazenamento, os explantes ainda apresentaram crescimento expressivo, sendo de 2 cm com 45 g/L de sacarose.

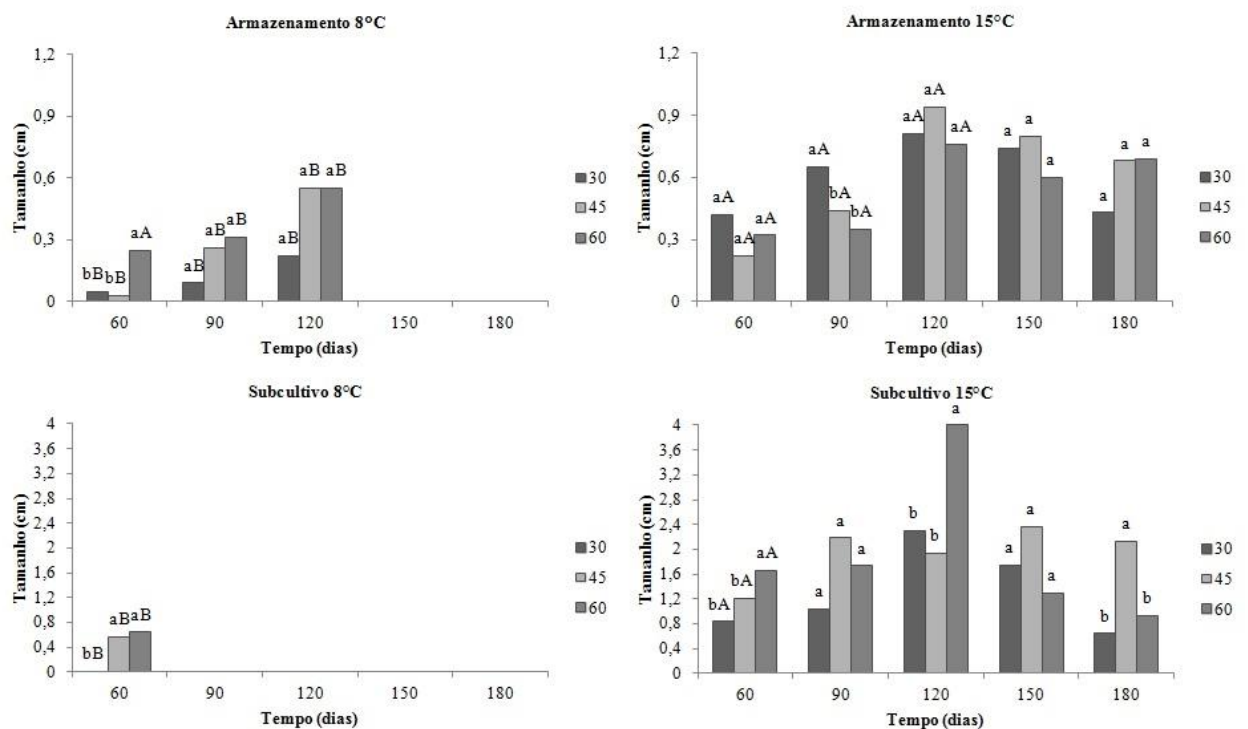


Figura -1 Tamanho (cm) de segmentos nodais de *H. serratifolius* após o armazenamento por diferentes períodos (60, 90, 120, 150 e 180 dias) nas temperaturas de 8 e 15°C em diferentes concentrações de sacarose, 30, 45 e 60 g/L e após 30 dias de subcultivo em meio WPM novo. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Em relação à formação de calos, após o armazenamento não foram notados calos na temperatura de 8°C enquanto para 15°C houve formação a partir dos 120 dias sendo que as maiores ocorreram aos 120 e 150 dias de armazenamento com 30 gramas de sacarose e representando cerca de 40% dos explantes (Figura 2).

Já para os 30 dias de subcultivo após o armazenamento, observou-se uma grande formação de calos para todos os períodos de armazenamento. Para 8°C, a porcentagem de calos ficou entre 60 e 80% nas concentrações de 45 e 60 g/L de sacarose. Para 15°C houve uma maior formação, onde aos 120 dias a porcentagem de formação de calos variou entre 80 e 100%. Para 180 dias de armazenamento por sua vez, essa porcentagem foi mais baixa, entre 40e 60%, em todas as concentrações de sacarose utilizadas.

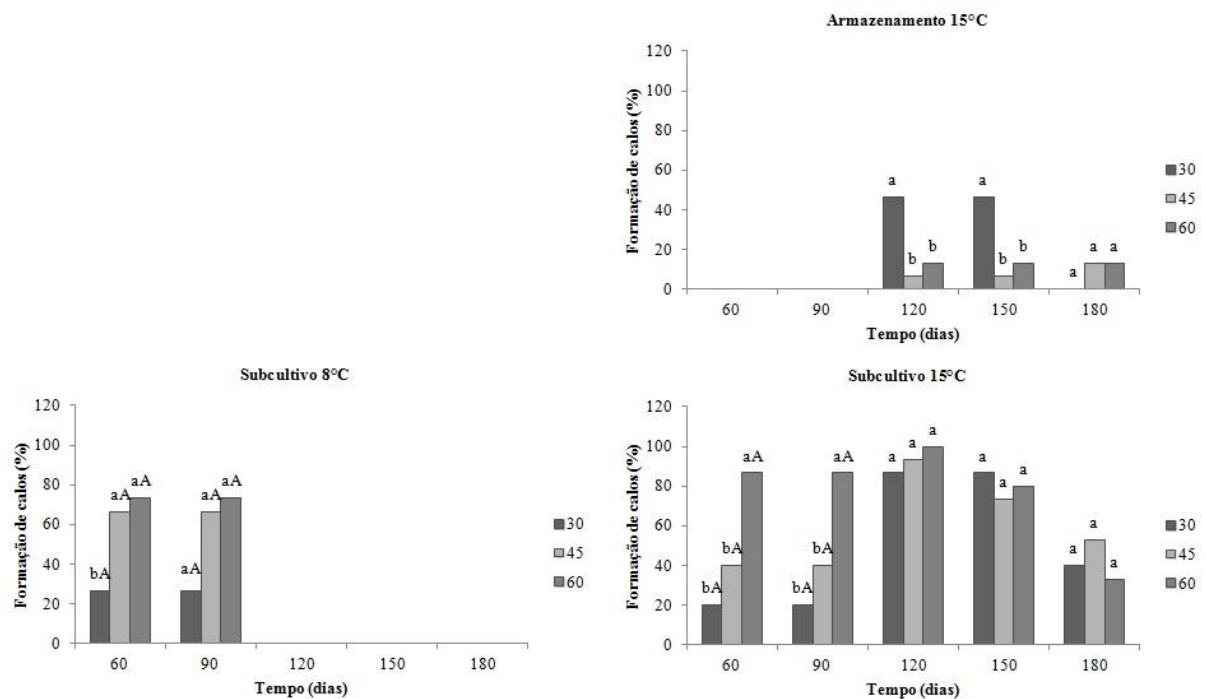


Figura -2 Porcentagem de formação de calos em segmentos nodais de *H. serratifolius* após o armazenamento por diferentes períodos (60, 90, 120, 150 e 180 dias) nas temperaturas de 8 e 15°C em diferentes concentrações de sacarose, 30, 45 e 60 g/L e após 30 dias de subcultivo em meio WPM novo. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Para formação de raízes, houve uma pequena formação aos 15°C somente, porém em todos os períodos de armazenamento (Figura 3). As maiores formações ocorreram aos 90 dias, abrangendo até 25% dos explantes. Já para o subcultivo, a porcentagem de raízes formadas foi

a mesma obtida após o armazenamento, não indicando assim, a formação de novas raízes, apenas a manutenção das que já haviam sido formadas anteriormente.

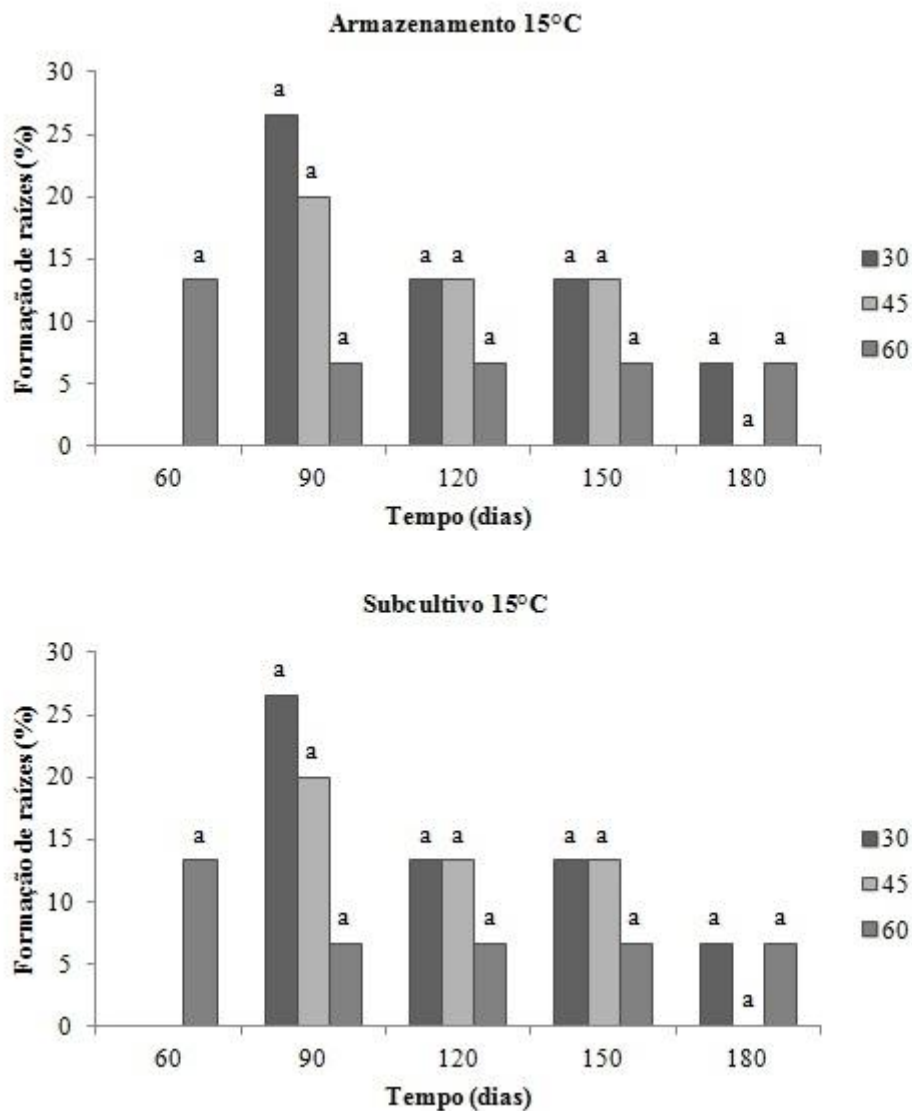


Figura -3 Porcentagem de formação de raízes em *H. serratifolius* após o armazenamento por diferentes períodos (60, 90, 120, 150 e 180 dias) nas temperaturas de 8 e 15°C em diferentes concentrações de sacarose, 30, 45 e 60 g/L e após 30 dias de subcultivo em meio WPM novo. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Para o número de brotos, após o armazenamento, observou-se que de maneira geral houve uma menor formação na temperatura de 8°C, principalmente aos 120 dias. Já para 15°C houve uma média de formação consistente em todos os períodos de armazenamento, entre 1 e 1,6 (Figura 4).

Já para o subcultivo, a temperatura de 8°C, assim como nas variáveis anteriores, não se mostrou eficiente para o reestabelecimento dos segmentos nodais e o incremento do número

de brotos. Para a temperatura de 15°C, notou-se que a média de brotos foi similar a do armazenamento, sendo maior que 2 apenas aos 180 dias.

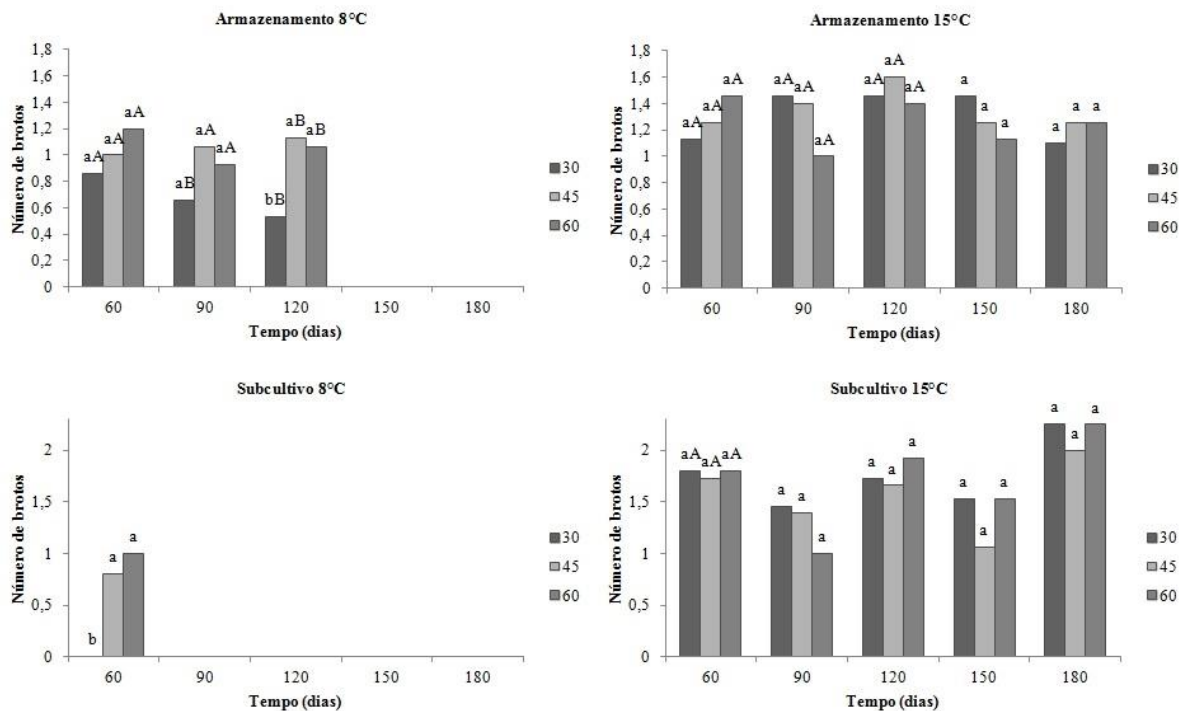


Figura – 4 Número médio de brotos em segmentos nodais de *H. serratifolius* após o armazenamento por diferentes períodos (60, 90, 120, 150 e 180 dias) nas temperaturas de 8 e 15°C em diferentes concentrações de sacarose, 30, 45 e 60 g/L e após 30 dias de subcultivo em meio WPM novo. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Já para o número médio de folhas, observou-se uma maior variação para as médias ao longo do período de armazenamento (Figura 5). Após o armazenamento, por exemplo, a 8°C não houve formação de folhas aos 90 dias sendo as maiores formações encontradas com 60 dias, 45 e 60 g/L de sacarose, e 120 dias com 60 g/L de sacarose. Já para 15°C, de maneira geral as maiores médias foram aos 120 dias, entre 2 e 2,5.

Para o subcultivo, aos 15°C essa variação foi maior ainda. Observou-se maiores médias principalmente nos extremos do armazenamento seguido do meio, 120 dias. Sendo que o maior valor médio foi de 8,2 aos 60 e 180 dias.

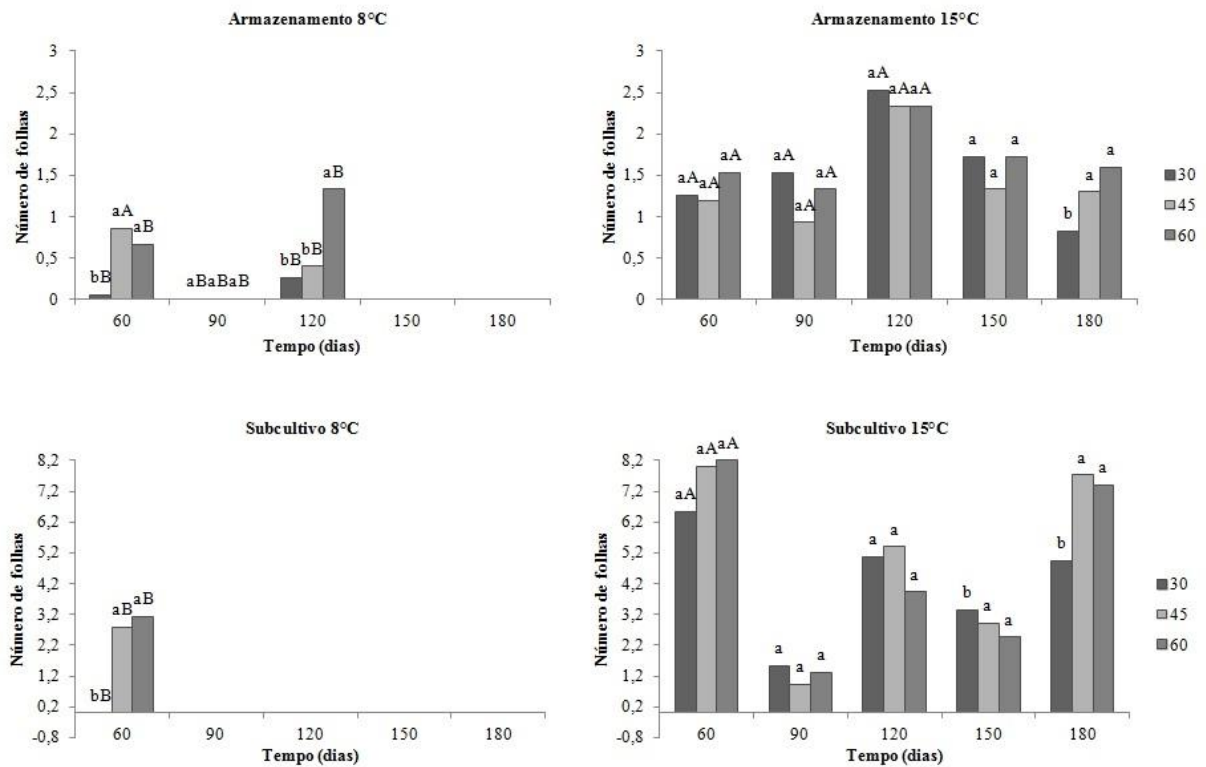


Figura -5 Número médio de folhas em segmentos nodais de *H. serratifolius* após o armazenamento por diferentes períodos (60, 90, 120, 150 e 180 dias) nas temperaturas de 8 e 15°C em diferentes concentrações de sacarose, 30, 45 e 60 g/L e após 30 dias de subcultivo em meio WPM novo. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Em relação à sobrevivência, aos 8°C foi observada uma porcentagem de 100% principalmente nas maiores concentrações de sacarose (Figura 6). Porém, aos 120 dias essa porcentagem diminuiu drasticamente, chegando apenas a 40% e a partir desse período não foram observados explantes vivos. Para 15°C, o contrário ocorreu sendo que as porcentagens se mantiveram altas entre 80 e 100% começando a decair apenas com 150 dias mas ainda assim se mantendo elevadas aos 180 dias entre 40 e 66%.

Para o subcultivo, aos 8°C, já com 90 dias de armazenamento não houve explantes sobreviventes. Já para 15°C, notou-se que todos os explantes que conseguiram sobreviver aos períodos de armazenamento, também conseguiram sobreviver após os 30 dias de subcultivo.

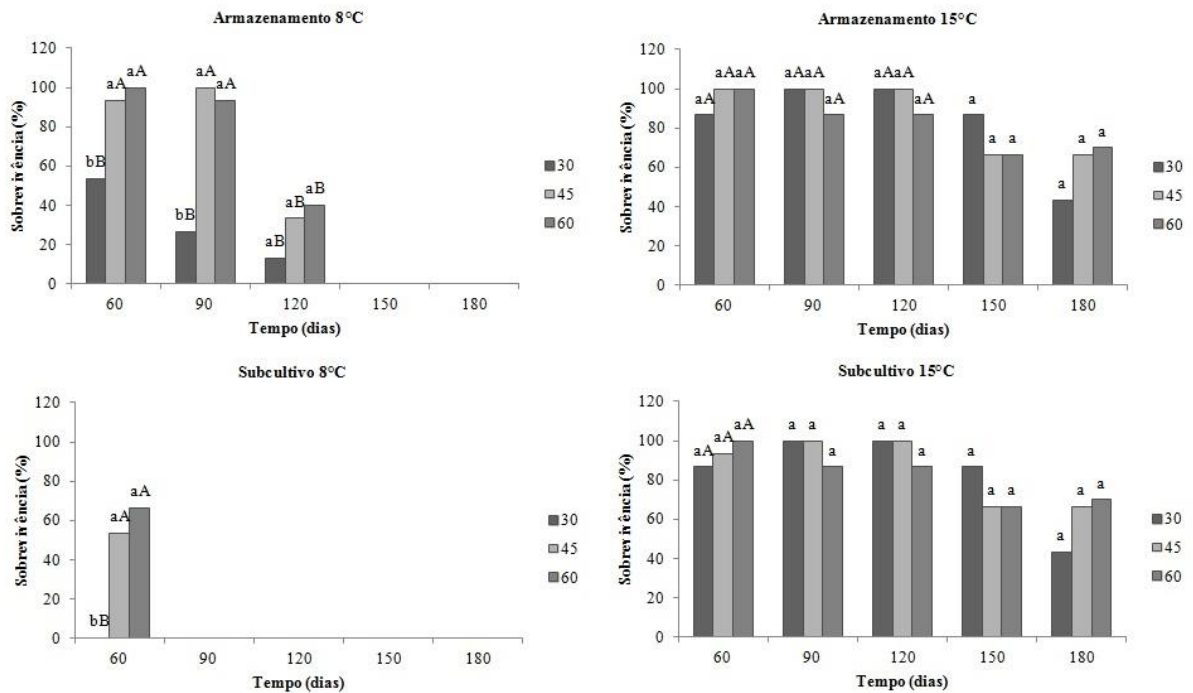


Figura -6 Porcentagem de sobrevivência em segmentos nodais de *H. serratifolius* após o armazenamento por diferentes períodos (60, 90, 120, 150 e 180 dias) nas temperaturas de 8 e 15°C em diferentes concentrações de sacarose, 30, 45 e 60 g/L e após 30 dias de subcultivo em meio WPM novo. Letras minúsculas diferem barras entre as concentrações de sacarose e maiúsculas entre as temperaturas testadas.

Após os períodos de armazenamento nas diferentes temperaturas, os segmentos nodais se apresentaram verdes sem formação de novos brotos evidentes, ou com brotos bem formados evidenciando folhas principalmente na maior temperatura de 15°C. Poucos tiveram formação de raízes. Na menor temperatura, houve necrose em muitos segmentos, na parte basal ou no ápice, sendo que podiam também estar totalmente necrosados. Após 150 dias, foi verificado que todos os segmentos que estavam na menor temperatura, apresentaram esse aspecto sendo então descartados (Figura 7).



Figura 7 - Aspectos de segmentos nodais de *H. serratifolius* após os tempos de armazenamento nas temperaturas de 8°C e 15°C em meio WPM com diferentes concentrações de sacarose (30, 45 e 60g). Segmento nodal que sobreviveu após o armazenamento (A). Segmento nodal com broto em evidência (B). Segmento nodal com formação de raiz (C). Segmento nodal com necrose na parte basal (D). Segmento nodal com necrose no ápice (E). Segmento nodal necrosado (F). Aspecto geral dos segmentos nodais armazenados a 8°C após 150 e 180 dias. Barra = 0,5 cm.

Após 30 dias de subcultivo, alguns segmentos nodais também se apresentavam necrosados, principalmente os da menor temperatura, mas houve retomada do crescimento com formação de novos brotos, folhas e calos mesmo em alguns segmentos que apresentavam partes já com essa característica (Figura 8). Essa necrose ocorreu primeiramente nos ápices dos explantes, podendo ter se estendido por todo o segmento nodal a partir de então.

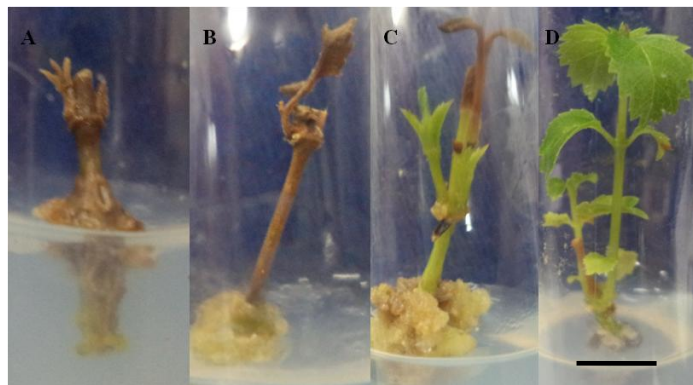


Figura 8 - Aspectos gerais de segmentos nodais após o subcultivo em meio WPM contendo 1,0 μ M de BAP + 0,25 μ M de ANA durante 30 dias. Segmento nodal necrosado (A). Segmento nodal necrosado evidenciando calos na base (B). Segmento nodal regenerado com formação de brotos e com ápice necrosado (C). Segmento nodal com crescimento retomado com presença de brotos (D). Barra = 1cm.

Neste trabalho, apenas aos três meses, o tamanho dos segmentos nodais foi menor com uma maior concentração de sacarose adicionada ao meio. Porém, a adição de menores concentrações como 30 gramas, já parece ser suficiente para retardar o crescimento de *H. serratifolius* até os seis meses de armazenamento.

De acordo com Bekheet (2007), a adição de agentes osmóticos para a cultura *in vitro* é um método eficiente de inibição do crescimento, causando redução das atividades

metabólicas da planta sem afetar a viabilidade e também aumentando a vida útil de armazenamento de tecidos cultivados *in vitro* em diferentes espécies de plantas.

Isso ocorre porque a adição de agentes osmóticos, como a sacarose, diminui o potencial osmótico fazendo com que, conseqüentemente, a disponibilidade de água seja limitada. Assim, a absorção de água e nutrientes pelo explante é afetada fazendo com que ocorra uma desaceleração do metabolismo do vegetal o que ocasiona na diminuição do crescimento (CALDAS et al., 1998).

Contudo, a sacarose pode, por outro lado, incrementar o desenvolvimento *in vitro* dos explantes, uma vez que é considerada como uma das principais fontes de carbono prontamente disponível (SANTOS, et al., 2011), o que pode ter contribuído por em conjunto com uma temperatura mais elevada, fazer com que o crescimento dos segmentos nodais ainda assim ocorresse de maneira expressiva.

A sacarose é uma das fontes de carbono mais testadas, entretanto esse agente osmótico promoveu os maiores valores de altura e maiores taxas de multiplicação em crescimento lento se comparada com manitol e sorbitol, por isso foi considerada inadequada para a conservação de *Mandevilla moricadiana* (CORDEIRO, et al., 2014). Contudo, esse trabalho não teve a diminuição da temperatura como ocorreu aqui.

Um dos fatores mais importantes no crescimento lento é a redução da temperatura, muitas vezes em conjunto com a redução ou a supressão da intensidade luminosa, o que limita o crescimento de brotos a partir, por exemplo, da indução de calos e proliferação da base desses brotos (TREJGELL; KAMINSKA; TRETIN, 2015). Tanto a menor temperatura quanto a redução da luminosidade vão diminuir o metabolismo do vegetal uma vez que afetam as etapas da fotossíntese, gerando assim menos energia e menos carbono disponível para o desenvolvimento do explante.

O crescimento na menor temperatura, foi significativamente menor do que a 15°C durante o armazenamento nos primeiros meses, porém a sobrevivência foi menor principalmente quando utilizado uma menor concentração de sacarose. Isso pode ser devido ao estresse imposto aos segmentos nodais quando eles foram transferidos das condições de cultivo ótimas para o armazenamento a frio (OZUDOGRU, et al., 2013), principalmente por essa espécie ser considerada de clima tropical, o que pode justificar a morte dos explantes em baixa temperatura em períodos maiores de armazenamento ao frio.

O crescimento das plantas durante o armazenamento pode ser suprimido pela diminuição da temperatura, mas a temperatura ótima de armazenamento depende da espécie. Tipicamente, uma temperatura entre 1-10 °C, será apropriado para as espécies de clima

temperado (TREJGELL; KAMINSKA; TRETIN, 2015). O que não é o caso da espécie utilizada neste trabalho. Para as espécies tropicais, geralmente sensíveis ao frio, temperaturas entre 15-20 °C são utilizadas (ENGELMANN, 2011).

O armazenamento a frio resultou em necrose e escurecimento de explantes que normalmente começou na região apical e se espalhou pra base ao longo do tempo na temperatura de 8°C como também foi observado para variedades de ameixa armazenadas a 4°C (GIANNÍ; SOTTILI, 2015).

Vários autores atribuem a necrose e escurecimento durante o armazenamento refrigerado à presença de luz sendo portanto, importante que o escuro seja utilizado (HAUSMAN et al. 1994; ROMANO ; MARTINS-LOUÇÃO, 1999). Além disso, Bairus et al. (2009) supõe que, quando as plantas são cultivadas em meio livre de citocinina, as citocininas são esgotados a partir do segmento nodal e a ausência de raízes diminui o nível endógeno de citocinina, parando a divisão celular e causando necrose apical.

De maneira geral, o primeiro subcultivo apresentou aos 15°C, alta porcentagem de sobrevivência e desenvolvimento normal após os períodos de armazenamento, produzindo plântulas vigorosas. Vários autores tem assumido que a exposição ao frio prolongado poderia reduzir a dormência e induzir mudas vigorosas (MULLIN; SCHLEGEL, 1976; PÉREZ-TORNERO et al. 1999), beneficiando a retomada do crescimento.

Além disso, após alguns períodos de armazenamento, os maiores tamanhos foram encontrados na maior concentração de sacarose, assim como a taxa de sobrevivência com 6 meses, também foi maior nas concentrações mais elevadas desse agente osmótico. Taxas mais baixas de retomada de crescimento e proliferação depois de armazenamento de segmentos nodais em meio com um teor reduzido de sacarose pode ser devido a reservas de carboidratos reduzidos nos tecidos o que pode acarretar a uma redução no potencial de regeneração (TREJGELL; KAMINSKA; TRETIN, 2015).

3.1.1 Aclimatização

As plântulas aclimatizadas após todos os períodos de armazenamento a 15°C, obtiveram em todas as concentrações de sacarose, sobrevivência após 30 dias de aclimatizadas. Todas as plantas que sobreviveram, apresentaram formação de raízes adventícias (Figura 9). Aos 180 dias de armazenamento e na concentração de 30 g de sacarose, não foi realizada a aclimatização por falta de material sobrevivente.

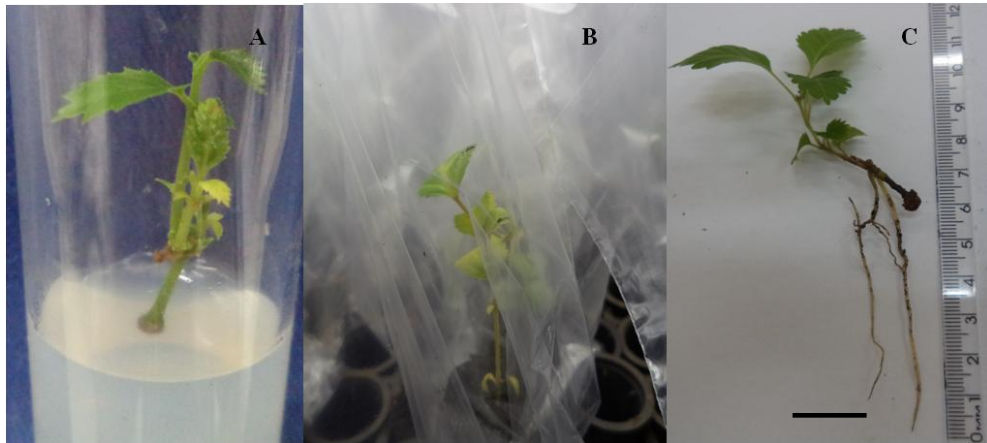


Figura 9 - Plântula de *H. serratifolius* após 45 dias de cultivo em meio WPM com $1,0\mu\text{M}$ de BAP e $0,25\mu\text{M}$ de ANA antes da aclimatização (A). Plântulas de *H. serratifolius* durante a aclimatização (B). Plantas de *H. serratifolius* após 30 dias de aclimatização evidenciando a formação de raízes (C). Barra = 2cm.

Em relação às variáveis analisadas, apenas o número de folhas diferiu estatisticamente para plântulas que foram armazenadas por 60 dias, sendo a concentrações de 30 e 45 com maiores médias (Tabela 1).

Todas as demais variáveis não diferiram entre si em nenhum tempo de armazenamento entre as concentrações de sacarose utilizadas, tendo porcentagem de sobrevivência de 50% das plântulas no último período de armazenamento nas concentrações de 45 e 60g de sacarose.

Tabela 1 - Porcentagem de sobrevivência (Sob %), tamanho da parte aérea (P.A cm), número de folhas e presença de raiz (%) de plântulas de *H. serratifolius* com 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento em temperatura de 15°C nas diferentes concentrações de sacarose (30, 45 e 60g) depois de subcultivadas em meio WPM com 1,0µM de BAP + 0,25µM de ANA durante 45 dias, após 30 dias de aclimatização.

	2 meses				3 meses				4 meses				5 meses				6 meses			
	Sob. (%)	P.A (cm)	Nº folhas	Raiz	Sob. (%)	P.A (cm)	Nº folhas	Raiz	Sob. (%)	P.A (cm)	Nº folhas	Raiz	Sob. (%)	P.A (cm)	Nº folhas	Raiz	Sob. (%)	P.A (cm)	Nº folhas	Raiz
30	80a	5,75a	4,90a	80a	60a	3,90a	4,60a	60a	60a	4,20a	3,00a	60a	50a	2,90a	1,80a	50a	--	--	--	--
45	90a	5.80a	7,00a	90a	70a	5,55a	4,90a	70a	50a	2,90a	1,75a	50a	60a	3,10a	2,20a	60a	50a	2,50a	2,00a	50a
60	90a	6.10a	4,30b	90a	60a	3,45a	4,50a	60a	50a	3,40a	2,10a	50a	60a	3,24a	2,40a	60a	50a	2,65a	1,80a	50a

A aclimatização é uma das etapas mais difíceis de se obterem sucesso na micropropagação. Isso porque, nesta fase as plântulas são retiradas de condições controladas *in vitro*, e são transferidas para casa de vegetação *ex vitro* (MOREIRA et al., 2006) e depois para o campo. Essas plântulas são mais sensíveis uma vez que não possuem cutículas bem desenvolvidas nem paredes celulares rígidas. A taxa fotossintética também é bastante reduzida e os estômatos são não funcionais (COUTO; WAGNER-JUNIOR; QUEZADA, 2003).

Além disso, se a plântula não tiver raízes desenvolvidas antes da aclimatização, como foi o caso deste trabalho, maior ainda será a dificuldade. A formação de um sistema radicular adventício nas brotações provenientes do cultivo *in vitro*, é essencial para a aclimatização, tornando a planta completa (LENCIANI et al., 2014). Isso pode ser comprovado pelo resultado obtido neste trabalho, onde todas as plantas que sobreviveram à aclimatização apresentaram formação de raízes adventícias.

É importante ressaltar que, essa formação ocorreu devido aos níveis de auxina endógenos as plântulas, uma vez que não houve exposição a nenhum regulador de crescimento antes dessa etapa. Isso é interessante, já que uma das etapas básicas da micropropagação foi suprimida, a de enraizamento. Com isso, uma maior rapidez e facilidade de transplântio podem ser obtidas para *H. serratifolius* além de gerar uma economia para a produção de mudas dessa espécie.

3.2 Droplet vitrification

Não houve regeneração de segmentos nodais criopreservados em nenhum dos tempos de exposição ao PVS2 testados (Figura 11A). Os segmentos nodais que foram expostos ao crioprotetor mas que não passaram pelo nitrogênio líquido tiveram 100% de regeneração (Figura 5B). Contudo, para os demais tempos de exposição sem a imersão em NL, notou-se que para o maior tempo, 120 minutos, não houve regeneração, sendo a maior porcentagem, de 46,6%, encontrada aos 30 minutos de exposição ao PVS2 (Figura 10).

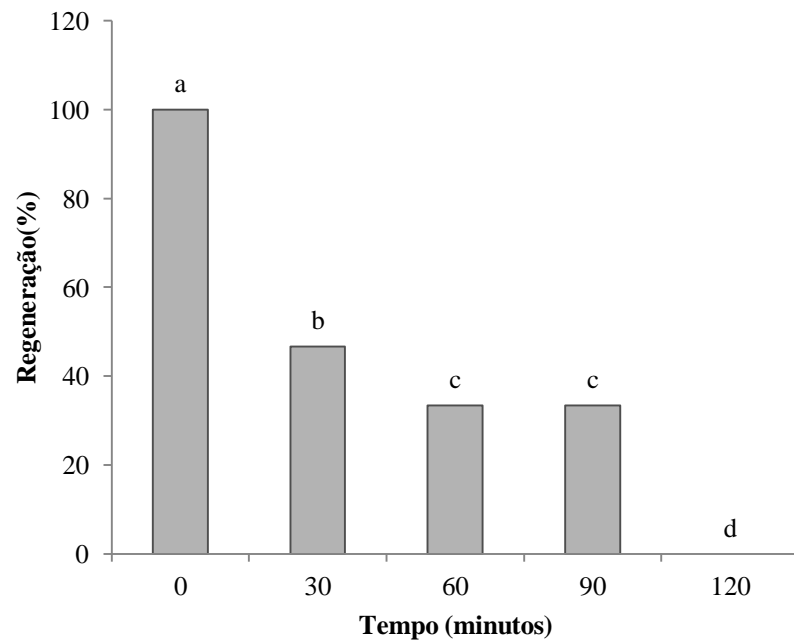


Figura 10 - Porcentagem de regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* em meio de cultivo WPM suplementado $1\mu\text{M}$ de BAP combinado com $0,25\mu\text{M}$ de ANA após a exposição em diferentes tempos de PVS2, aos 30 dias de cultivo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

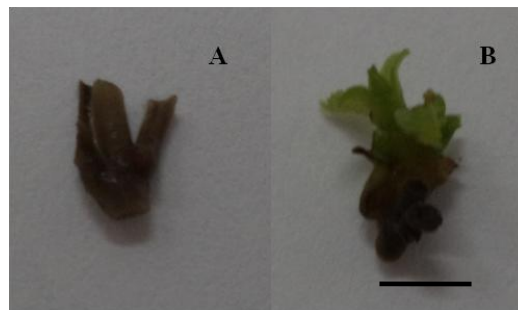


Figura 11 - Segmentos nodais de *H. serratifolius* criopreservadas posteriormente exposição aos tempos de PVS2 após 30 dias de cultivo em meio WPM suplementado com $1\mu\text{M}$ de BAP + $0,25\mu\text{M}$ de ANA (A). Brotos provenientes de segmentos nodais de *H. serratifolius* não criopreservadas posteriormente a exposição aos tempos de PVS2 após 30 dias de cultivo em meio WPM suplementado com $1\mu\text{M}$ de BAP + $0,25\mu\text{M}$ de ANA (B). Barra = 2mm.

A baixa porcentagem de regeneração quando comparada ao controle (sem exposição ao PVS2), pode estar relacionada com a alta toxicidade que substâncias que compõe esse crioprotetor, exercem sob as células. Um dos componentes presentes no PVS2, o DMSO (dimetilsulfóxido) pode ser responsável por causar danos letais às células em casos de temperaturas de imersão acima de 0°C ou então exposição em tempos prolongados (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; FULLER, 2004), como é o caso dos 120 minutos neste trabalho, não sendo possível dessa forma, a regeneração de nenhum segmento nodal.

Outro fator que pode ter ocorrido, é que apenas o uso do crioprotetor nos menores tempos de exposição, pode não ter sido suficiente para mitigar os danos causados as células quando as mesmas são expostas à -196°C do NL. Isso pode ter acontecido por uma insuficiente desidratação e conseqüentemente a grande quantidade de água que restou no meio intracelular, se tornando assim, cristais de gelo que foram responsáveis por danos irreversíveis nas membranas levando ao extravasamento do conteúdo celular (MAZUR, 1984; SURANTHRAN et al., 2012).

Uma das possibilidades para que a *Droplet Vitrification* obtenha sucesso, é o pré-cultivo dos explantes em meio de cultivo altamente concentrados (0,3-0,7 M) em sacarose por um determinado período de tempo. O pré-cultivo pode minimizar os danos celulares, uma vez que o efeito osmótico induzido, causa uma desidratação dos tecidos capaz de reduzir o ponto de congelamento da água (PANIS et al., 1996; CARPENTIER et al., 2010). Neste trabalho, fez-se o uso de 0,3M de sacarose durante 24 horas. Uma alternativa seria aumentar a concentração de sacarose do meio e/ou o tempo de permanência dos explantes em contato com a sacarose. Além disso, o uso de agentes osmóticos como a prolina combinados com a sacarose, podem aumentar a regeneração de explantes criopreservados como ocorreu para segmentos nodais de mangabeira em que 83% de regeneração foi observada com o uso de 0,1M de prolina no pré-cultivo (PRUDENTE et al., 2014).

Além dessas possibilidades, outro fator que pode estar relacionado com o insucesso dessa técnica neste trabalho, é o tempo de exposição ao PVS2. Isso porque, o primeiro tempo testado, 30 minutos, pode ter sido muito elevado para a exposição dos segmentos nodais e contribuído para o efeito citotóxico do PVS2 culminando assim com a morte de todos os explantes. O uso de um tempo menor, talvez já seja suficiente para que a técnica seja concluída com sucesso.

3.3 PVS2 Vitrification

Não houve regeneração de segmentos nodais nos maiores tempos de exposição ao PVS2, 60, 75 e 90 minutos. A maior porcentagem de regeneração ocorreu na ausência de exposição ao crioprotetor (100%) (Figura 14C). Em relação aos segmentos expostos ao PVS2, a maior regeneração, 66,6%, foi no menor tempo, 15 minutos (Figura 12).

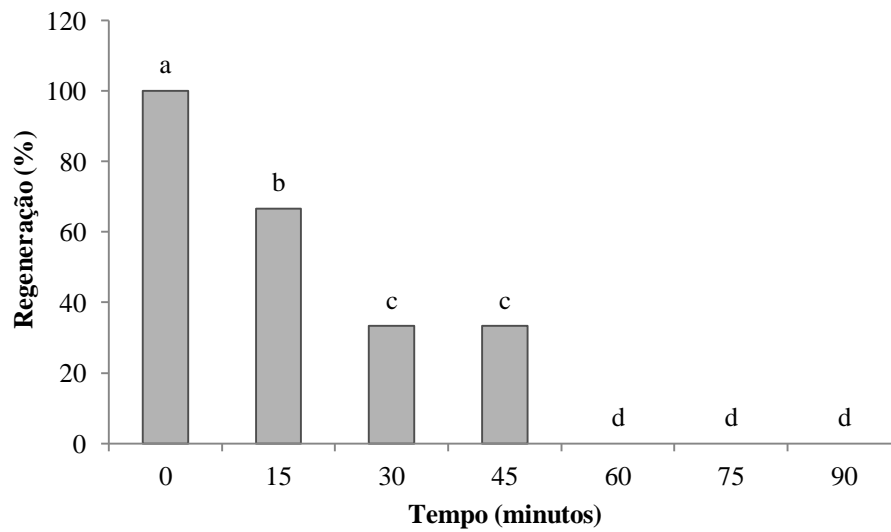


Figura 12 - Porcentagem de regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* em meio de cultivo WPM suplementado $1\mu\text{M}$ de BAP combinado com $0,25\mu\text{M}$ de ANA após a exposição em diferentes tempos de PVS2, aos 30 dias de cultivo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Já para as segmentos nodais que foram criopreservadas, as que não foram expostas ao crioprotetor assim como as que foram expostas por maiores tempos (45, 60, 75 e 90 minutos), não regeneraram (Figura 14 D-E). Porém, aos 15 minutos de exposição ao PVS2, notou-se uma porcentagem de regeneração de 53,3% (Figura 13) (Figura 14A-B).

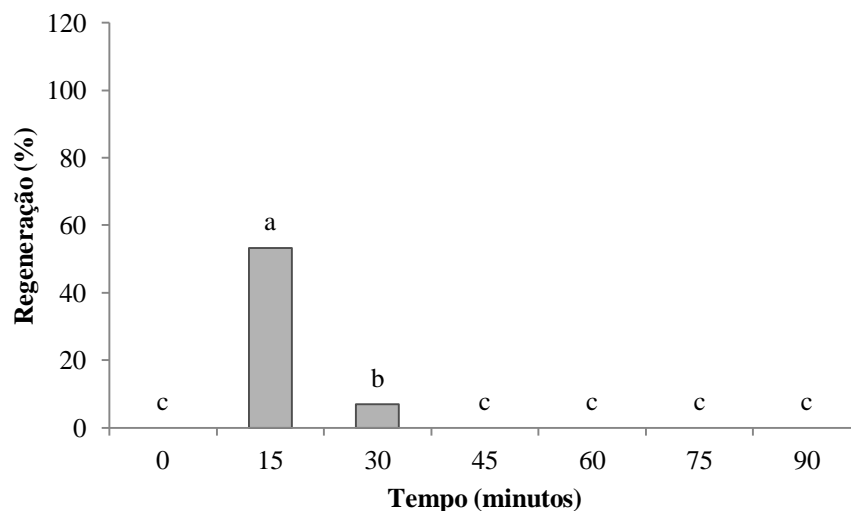


Figura 13 - Porcentagem de regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* criopreservadas em meio de cultivo WPM suplementado $1\mu\text{M}$ de BAP combinado com $0,25\mu\text{M}$ de ANA após a exposição em diferentes tempos de PVS2, aos 30 dias de cultivo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

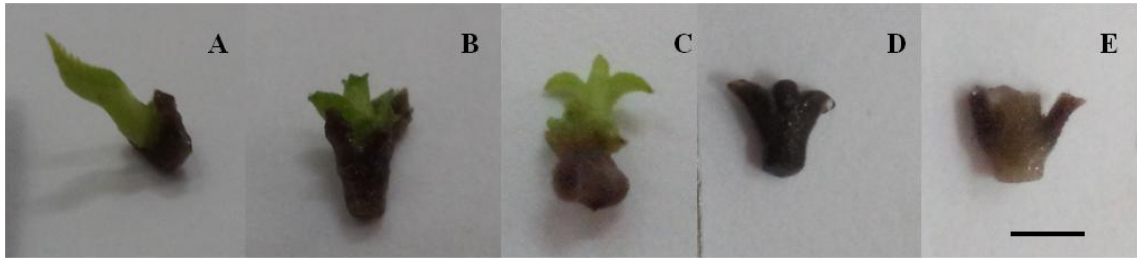


Figura 14 - Regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* criopreservadas após exposição ao PVS2 depois de 30 dias de cultivo em meio WPM com 1,0 μM de BAP + 0,25 μM de ANA (A, B). Regeneração de segmentos nodais de *H. serratifolius* não criopreservadas após exposição ao PVS2 depois de 30 dias de cultivo em meio WPM com 1,0 μM de BAP + 0,25 μM de ANA (C). Aspecto de segmentos nodais de *H. serratifolius* que não sobreviveram após a criopreservação e exposição ao PVS2 depois de 30 dias de cultivo em meio WPM com 1,0 μM de BAP + 0,25 μM de ANA (D, E). Barra = 2mm.

As técnicas de *droplet vitrification* e vitrificação diferem principalmente no descongelamento, onde na *droplet* este também é ultrarrápido como no congelamento, diferentemente da vitrificação, em que ocorre um reaquecimento rápido (CONDELLO et al, 2011; PANIS, PIETTE; SWENNEN, 2005; SAKAI; ENGELMAN, 2007).

Dessa forma, a recristalização pode ocorrer uma vez que o descongelamento não é realizado de forma tão rápida quanto na *droplet vitrification*. Na recristalização, acontece a junção de cristais de gelo menores, o que facilmente pode danificar as membranas das células levando a morte das mesmas (GONZALEZ-ARNÃO et al., 2008; HOPKINS et al., 2012; MAZUR, 1984). Nesse caso, a comparação das duas técnicas pode significar um maior sucesso na *droplet vitrification* como relatado para criopreservação de ápices caulinares de mangabeira (SANTOS et al., 2015).

Contudo, isso não ocorreu neste trabalho. Uma das razões para isso é o menor tempo utilizado para esta técnica, o que proporcionou a desidratação ideal sem que o efeito tóxico do PVS2 fosse letal as células de *H. serratifolius*.

Outro motivo possível para isso, seria o uso de solutos orgânicos, como a prolina, no pré cultivo das segmentos nodais juntamente com sacarose na vitrificação. O uso de solutos orgânicos pode induzir a estabilização das membranas agindo similar a um crioprotetor (CAROLSFELD et al, 2003), protegendo as membranas das células e enzimas de danos que são irreversíveis ao congelamento à -196°C em NL (UBERTI et al, 2014).

O uso de 0,1M de prolina, como neste trabalho, foi satisfatório para segmentos nodais de mangabeira, em que a regeneração foi 30% maior nessa concentração (PRUDENTE et al., 2014) e para gemas de videira com pré-cultivo em MS acrescidos de 0,5 μM de prolina onde

maior taxa de sobrevivência também foi observada (MARKOVIC et al., 2013), ambos utilizando *droplet vitrification*.

4 CONCLUSÃO

A criopreservação de segmentos nodais de *H. serratifolius* foi de 53,3% após exposição à solução vitrificante PVS2 por 15 minutos.

É possível armazenar segmentos nodais de *H. serratifolius* por 180 dias à 15°C com sobrevivência de 70% com adição de 60g de sacarose.

5 REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Germinação de sementes de ipê-branco em diferentes substratos e meios de cultura. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 22, n. 3,4 p. 162-167, 2010.
- BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 239–248, 2009.
- BARBOSA, T.P.; NETO, H.D. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de química orgânica experimental. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 331-34, 2013.
- BEKHEET, S. A. et al. Application of cryopreservation technique for In vitro Grown Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultures. **Journal of Applied Sciences Research**, Paquistão, v. 3, p. 859-866, 2007.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa/CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Malden, v.63, p.472-489, 2003.
- CARPENTIER, S.C. et al. Sugar-Mediated Acclimation: The Importance of Sucrose Metabolism in Meristems. **Journal of Proteome Research**, Washington v. 9, p. 5038–5046, 2010.
- CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, p. 397-403, 2011.
- CONDELLO, E. et al. Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. **CryoLetters**, London, v. 32, n. 2, p. 175-185, 2011.

CORDEIRO, S. Z. et al. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments. **In Vitro Cellular ; Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 50, n.3, p. 326–336, 2014.

COSTA, A.M. **Estudo do mecanismo de ação citotóxica de naftoquinonas sintéticas análogas do lapachol**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Faculdade de medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

COUTO M; WAGNER JÚNIOR A; QUEZADA AC. 2003. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, p. 125-128, 2003.

DOUSSEAU, S. et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In **Vitro Cellular ; Developmental Biology –Plant**, Wallingford, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, London, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

GIANNÍ S.; SOTTILE F. *In vitro* storage of plum germplasm by slow growth. **Horticultural Science**, Prague, v. 42, p. 61–69, 2015.

GONÇALVES, L.H.N. **Qualidade fisiológica e expressão de proteínas em sementes de *Handroanthus serratifolia* submetidas à secagem**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

GONZÁLES, F.J.J.; VELOZA, L.A.; ARIAS, J.C.S. Anti-infectious activity in plants of the genus *Tabebuia*. **Revista Universitas Scientiarum**, Bogotá, v. 18, n. 3, p. 257-267, 2013.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.92, p. 1- 13, 2008.

HAUSMAN, J.F. et al. Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of poplar shoots. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 38, p. 65–67, 1994.

HOPKINS, J. B. et al. Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 169-178, 2012.

LENCIANI, K. H. et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, 2014.

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

MARKOVIC, Z. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. **Central European Journal of Biology**, Warsaw, v.8, p.993-1000, 2013.

MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; YAMADA, K. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 442–446, 1994.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 247, n. 3 part 1, p. C125– C142, 1984.

MOOSIKAPALA, L.; TE-CHATO, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 6, n. 2, p. 401-407, 2010.

MOREIRA, M.A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.5, p.825-879, 2006.

MULLIN R.H.; SCHLEGEL D.E. Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. **Horticulture Science**, Prague, v. 11, p. 100–101, 1976.

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

OLIVEIRA, A.B. et al. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bigoniáceas brasileiras. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 1-6, 1990.

ORLIKOWSKA, T. Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of two apple rootstocks. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 31, p.1–7, 1992.

OZUDOGRU, A. et al. *In vitro* conservation and cryopreservation of *Nandina domestica*: na outdoor ornamental shrub. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Romania, v. 41, p. 638-645, 2013.

PANIS, B. et al. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after pre-culture on sucrose. **Plant Science**, Watsonville, v.121, p. 95-106, 1996.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, Clare, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.

PÉREZ-TORNERO, O. et al. Medium-term storage of apricot shoot tips *in vitro* by minimal growth method. **Horticulture Science**, Prague, v. 34, p. 1277–1278, 1999.

PRUDENTE, D. O. Criopreservação de gemas laterais de mangabeira: o papel da prolina. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 86-93, 2014.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Berlin: Springer. 513p. 2008.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* Del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de Tejidos em la**

Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-714.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUCÃO, M. A. *In vitro* cold storage of cork oak shoot cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 59, p. 155–157. 1999.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo-letters**, London, v. 28, n.3, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, n.1, p. 30-33, 1990.

SANTOS, M. C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará. v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SANTOS, P. A. A. et al. Criopreservação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes): um protocolo para armazenamento a longo prazo. **Acta Scientiarum Agronomy**. [online]. v.37, n.3, p.289-296, 2015.

SOUZA, A. C. **Organogênese e Criopreservação de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. o. Grose**. 2014. 89p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SOUZA, A. C. et al. Dehydration and cryopreservation of *Handroanthus serratifolius* embryos. **Acta Horticulturae**, 1039:181-186, 2014.

SURANTHRAN, P. et al. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. **Plant Growth Regulation**, v. 66, p. 101, 2012.

TREJGELL, A.; KAMIN´SK, M.; TRETYN, A. *In vitro* slow growth storage of *Senecio macrophyllus* shoots. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 234, 2015.

UBERTI, M. F. et al. Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. **Brazilian archieve of biology and technology**. [online], vol.57, n.3, pp.374-380, 2014.

VISOTTO, L. M. S. **Comparação de eventos fenológicos e diversidade genética de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose (Bignoniaceae) em área urbana e rural**. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.