



RODRIGO MIRANDA MORAES

MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Tabebuia roseoalba* (Ridley) Sandwith E *Cybistax antisyphilitica* (Martius) Martius

**LAVRAS-MG
2018**

RODRIGO MIRANDA MORAES

**MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Tabebuia roseoalba* (Ridley)
Sandwith E *Cybistax antisyphilitica* (Martius) Martius**

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 obtenção do título de Doutor.

Prof.^a. Dr.^a. Fernanda Carlota Nery – UFSJ-MG
Orientadora

Prof. Dr. Sandro Barbosa – UNIFAL-MG

Prof. Renato Paiva Ph.D. – UFLA-MG

Prof.^a. Dr.^a. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva. – UFLA-MG
Co-orientadores

**LAVRAS-MG
2018**

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

Moraes, Rodrigo Miranda.

Micropropagação e criopreservação de *Tabebuia roseoalba*
(Ridley) Sandwith e *Cybistax antisyphilitica* (Martius) Martius /
Rodrigo Miranda Moraes. - 2018.

128 p. : il.

Orientador(a): Fernanda Carlota Nery.

Coorientador(a): Sandro Barbosa, Renato Paiva, Patrícia Duarte
de Oliveira Paiva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Conservação. 2. Propagação vegetativa. 3. Bignoniaceae. I.
Nery, Fernanda Carlota. II. Barbosa, Sandro. III. Paiva, Renato. IV.
Paiva, Patrícia Duarte de Oliveira. V. Título.

RODRIGO MIRANDA MORAES

**MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Tabebuia roseoalba* (Ridley)
Sandwith E *Cybistax antisiphilitica* (Martius) Martius**

**MICROPROPAGATION AND CRIOPRESERVATION OF *Tabebuia roseoalba* (Ridley)
Sandwith AND *Cybistax antisiphilitica* (Martius) Martius**

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 obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 20 de julho de 2018.
Dr. Plinio Rodrigues dos Santos – UNIFAL-MG
Dr. Thiago Corrêa de Souza – UNIFAL-MG
Dr. Breno Regis dos Santos – UNIFAL-MG
Dr^a. Débora de Oliveira Prudente – UFLA-MG

Prof.^a. Dr^a. Fernanda Carlota Nery – UFSJ-MG
Orientadora

**LAVRAS-MG
2018**

*Dedico esta realização aos meus pais
Maria Heloisa e Sebastião,
à minha amada Evellyn,
e a meu filho Pedro.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me inspirar, fortalecer e permitir essa conquista, e por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos pais Maria Heloisa de Miranda Moraes e Sebastião Francisco de Moraes (Zico), pela educação, exemplo, paciência e confiança. Apesar das dificuldades encontradas no dia a dia, nunca desistiram e sempre me ensinaram o caminho do bem, amo vocês.

A minha amada Evellyn Caroline dos Santos, que desde o início desta caminhada esteve ao meu lado. Muito obrigado pelo companheirismo, dedicação, incentivo e paciência para realização deste trabalho. E a meu filho Pedro Santos Miranda, a quem quero inspirar a voar ainda mais alto. Amo vocês!

À minha orientadora e professora Dr^a. Fernanda Carlota Nery (e Alice), por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pela orientação, confiança e respeito ao longo dessa etapa, muito obrigado.

Aos meus co-orientadores Sandro Barbosa (BIOGEN), Renato Paiva (LCTP) e Patrícia Paiva, pela orientação, colaboração, incentivo, amizade e ensinamentos, muito obrigado por tudo.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), em especial Lucas, Lermen, Judith e Mayara, Raphael e Rafaela, Debora Domiciano e Debora Prudente, Diogo Pedrosa e Michele Reis, e do BIOGEN, Prof. Breno, Prof. Thiago, Prof. Plínio, Dr^a Luciene (e Maria Luiza), Nathalia, Fernanda, Letícia, Marco Aurélio, Mateus, João Vitor, Zezinho e Valquíria pela amizade, ajuda nos trabalhos e agradável convivência, pelo estímulo, pela força, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP) por disponibilizar a estrutura física, corpo docente que possibilitaram a realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Alfenas e ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN) por me acolherem e contribuírem tanto para o meu aprendizado. Em extensão, agradeço à Dona Ciomara e Dona Val, pela paciência e incentivo nos trabalhos, muito obrigado.

A todos os professores dos Programas de Pós-Graduação da Universidade Federal de Lavras pelos ensinamentos e aos funcionários do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Salete, Daniella, Tanhan, Joel, Barrinha e Odorêncio pela boa vontade, dedicação, convívio alegre e excelência nas suas atividades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, para a realização desta Tese.

Ao Viveiro de Mudas Nordeste LTDA, pela parceria e fornecimento das sementes e material vegetal utilizado neste trabalho.

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível.”*

São Francisco de Assis.

RESUMO GERAL

A cultura de tecidos vegetais compreende técnicas especialmente utilizadas para conservação e propagação em larga escala, principalmente para espécies vegetais de importância econômica, ornamental e medicinal. Objetivou-se estabelecer um protocolo de micropropagação e criopreservação para *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica* (Bignoniaceae). A primeira parte apresenta uma introdução geral e uma revisão de literatura sobre as espécies estudadas e as principais técnicas de cultura de tecidos empregadas neste trabalho. Na segunda parte, são apresentados 4 artigos, de forma que os artigos 1 e 2 tratam da multiplicação *in vitro* de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, respectivamente. Antes do estabelecimento *in vitro*, efetuou-se um teste de germinação com sementes sem alas, desinfestadas e inoculadas em meio MS com GA₃. Para indução das brotações em *T. roseoalba*, os explantes consistiram de segmentos nodais contendo um par de gemas axilares, sem as folhas. Posteriormente, foi efetuado a rizogênese, seguida da aclimatização. Para germinação e estabelecimento *in vitro* de *T. roseoalba* recomenda-se a utilização de meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ para uma germinação acima de 80%. Para indução de brotações recomenda-se meio MS suplementado com uma combinação de BAP e KIN nas concentrações de 2,0 e 0,5 mg.L⁻¹, respectivamente, à 25 °C, para obtenção de 3,5 brotações por explante. Para rizogênese recomenda-se o uso de meio MS, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB e geleificado com ágar. Para aclimatização, recomenda-se o enraizamento prévio das brotações e a utilização de substrato comercial. Já para indução das brotações em *C. antisiphilitica*, foram testados diferentes explantes. Posteriormente, as brotações foram enraizadas e aclimatizadas. Para germinação e estabelecimento *in vitro* recomenda-se meio MS ou MS½, sem necessidade de GA₃. Para indução de brotações *in vitro* o melhor explante foi segmento nodal contendo um par de gemas axilares e sem as folhas, excisados de plantas com 30 dias de cultivo, e inoculados em meio MS com 8,0 mg.L⁻¹ de BAP. Para enraizamento *in vitro* recomenda-se meio MS, com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB. Para aclimatização, o transplantio das brotações deve ocorrer em substrato comercial. No artigo 3, foi feita a caracterização das massas calogênicas de ambas espécies. Desta forma, para calogênese de *C. antisiphilitica* recomenda-se hipocótilo ou folha cotiledonar como explantes, inoculados em meio MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA. A curva de crescimento dos calos em ambas espécies, apresentou crescimento do tipo sigmoidal. Em *T. roseoalba* houve maior frequência de calos com coloração marrom, enquanto para calos de *C. antisiphilitica* as colorações foram mais claras. O escurecimento dos calos em ambas espécies esteve diretamente correlacionado à peroxidação lipídica e a viabilidade dos calos. Calos de ambas espécies apresentaram baixo potencial embriogênico nas condições deste estudo. Por fim, no artigo 4, a criopreservação de sementes mostrou-se viável para conservação de germoplasma de ambas espécies. Apesar da indicação de perda de viabilidade por meio do teste de tetrazólio, não houve alteração do percentual e velocidade de germinação, percentual de plântulas normais e da sobrevivência das plantas à aclimatização.

Palavras-chave: Conservação. Propagação Vegetativa. Bignoniaceae. Cerrado.

GENERAL ABSTRACT

Plant tissue culture comprises techniques especially used for large-scale conservation and propagation, especially for plant species of economic, ornamental and medicinal importance. The objective was to establish a micropropagation and cryopreservation protocol for *Tabebuia roseoalba* and *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae). The first part presents a general introduction and a literature review on the species studied and the main tissue culture techniques employed in this work. In the second part, 4 articles are presented so that articles 1 and 2 deal with the *in vitro* multiplication of *T. roseoalba* and *C. antisyphilitica*, respectively. Prior to *in vitro* establishment, a germination test was performed with wingless, disinfested and inoculated seeds on MS medium with GA₃. For induction of shoots in *T. roseoalba*, the explants consisted of nodal segments containing a pair of axillary buds, without the leaves. Subsequently, the rhizogenesis was performed, followed by acclimatization. For germination and *in vitro* establishment of *T. roseoalba* the use of MS medium supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ of GA₃ is recommended for a germination above 80%. For broiler induction MS medium supplemented with a combination of BAP and KIN at 25 °C is recommended to obtain 3.5 shoots per explant. For rhizogenesis the use of MS medium supplemented with AIB 2.0 to 4.0 mg.L⁻¹ and agar gel is recommended. For acclimatization, it is recommended the previous rooting of the shoots and the use of commercial substrate. For the induction of shoots in *C. antisyphilitica*, different explants were tested. Later, the shoots were rooted and acclimatized. For germination and *in vitro* establishment MS or MS½ medium is recommended, with no need for GA₃. For induction of shoots *in vitro* the best explant was nodal segment containing a pair of axillary buds and without the leaves, excised of plants with 30 days of culture, and inoculated in MS medium with 8.0 mg.L⁻¹ of BAP. For *in vitro* rooting MS medium is recommended, with 2.0 mg.L⁻¹ of AIB. For acclimatization, transplanting of shoots should occur on commercial substrate. In article 3, the calogenic masses of both species were characterized. Thus, for calogenesis of *C. antisyphilitica* it is recommended hypocotyl or cotyledonary leaf as explants, inoculated in MS medium supplemented with 2.0 mg.L⁻¹ of ANA. The growth curve of the calli in both species showed sigmoidal growth. In *T. roseoalba* there was a higher frequency of calli with brown color, whereas for calli of *C. antisyphilitica* the colorations were clearer. Callus darkening in both species was directly correlated to lipid peroxidation and callus viability. Callus of both species had low embryogenic potential under the conditions of this study. Finally, in article 4, the cryopreservation of seeds proved to be viable for the conservation of germplasm of both species. In spite of the indication of loss of viability through the Tetrazolium test, there was no change in the percentage and germination speed, percentage of normal seedlings and the survival of the plants to acclimatization.

Keywords: Preservation, Vegetative Spread, Bignoniaceae, Cerrado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Aspecto visual de uma planta adulta em pleno florescimento localizada no campus da UFLA-MG (A), ramo com flores (B), e sementes com alas (esquerda) e sem alas (direita) (C) de *T. roseoalba*. Barra: 1 cm.....20
- Figura 2 - Aspecto visual de uma planta adulta de *C. antisiphilitica* localizado no município de Jataí - GO (A), ramo com flores (B), e fruto lenhoso fechado do tipo síliqua (C). Barra: 5 cm...23
- Figura 3 - Percentual de germinação (%) de sementes de *T. roseoalba*, em diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃). Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.....45
- Figura 4 - Estabelecimento *in vitro* de *T. roseoalba*: 24 horas após desinfestação e inoculação (A), aos 3 dias de cultivo *in vitro* (B), aos 7 dias de cultivo *in vitro* (C), aos 15 dias de cultivo *in vitro* (D) e aos 30 dias de cultivo *in vitro* (E). Barras: 1,0 cm.....46
- Figura 5 - Número médio de brotos independente da concentração (A) e comprimento do maior broto (B) em explantes de *T. roseoalba*, com 30 dias de cultivo *in vitro*. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.....46
- Figura 6 - Número médio de brotos por explante (A) e comprimento do maior broto (B) em *T. roseoalba*, em meio de cultura MS ou MS Modificado, e diferentes concentrações de citocininas. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam os meios de cultura. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.....49
- Figura 7 - Número de brotos por explante em *T. roseoalba*, submetidos a diferentes combinações entre as citocininas BAP e KIN, em meio de cultura MS ou WPM. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada combinação de citocininas e letras minúsculas comparam os meios de cultura. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.....50
- Figura 8 - Percentual de enraizamento (A) e comprimento de raiz principal (B) em brotações de *T. roseoalba* submetida a diferentes concentrações de auxinas (mg.L⁻¹). Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada auxina e letras minúsculas comparam as diferentes concentrações. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Brotações de *T. roseoalba* com 30 dias de cultivo *in vitro* inoculadas em meio de cultura MS suplementado com carvão ativado (C), Phytigel (D), Ágar (E) e brotação após 30 dias de enraizamento *in vitro* (F). Barras: 1,0 cm.....51
- Figura 9 - Variação do percentual de enraizamento de brotações (A) de *T. roseoalba*, submetida a diferentes concentrações de AIB (mg.L⁻¹), independentemente do meio de cultura e da concentração de carvão ativado. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste

Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Formação de massa calogênica na base dos explantes expostos tratamentos com AIB (B). Barra: 1 cm.....52

Figura 10 - Aclimatização de brotações de *T. roseoalba* com e sem raízes dispostas em substrato comercial (A) ou vermiculita (B), em tubetes de 250 cm³ (C) e envoltas por embalagem plástica transparente (D).....53

Figura 11 - Micrografias de secções paradérmicas da face abaxial de folha de *T. roseoalba* cultivada *in vitro* (A) e ao final da aclimatização (B), capturada por meio de fotomicroscópio com lente objetiva com aumento de 10x. Seta = estômatos.....54

Figura 12 - Percentual de germinação (%) de sementes de *C. antisiphilitica* (A), em diferentes meios de cultura e concentrações do regulador de crescimento ácido giberélico (GA₃). Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes concentrações de GA₃ e letras minúsculas comparam dentro de cada meio de cultura. Letras iguais dentro de cada tipo de meio de cultura não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão das médias. Protrusão radicular de semente (B), plântula germinada aos 7 dias (C) e aos 25 dias (D) de cultivo *in vitro*. Barras = 1,0 cm.....73

Figura 13 - Número médio de brotos (A) e comprimento do maior broto (B) com 30 dias de cultivo *in vitro*, e número médio de brotos (C) e comprimento do maior broto (D) com 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes explantes de *C. antisiphilitica* expostos ao BAP. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam os diferentes explantes. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).....74

Figura 14 - Número médio de brotos por explante (A), comprimento do maior broto (B) e percentual de sobrevivência dos explantes (C) de *C. antisiphilitica* expostos diferentes citocininas. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam os diferentes reguladores de crescimento. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Explante senescente (D) e explante sadio (E) de *C. antisiphilitica* expostos diferentes citocininas. Barras: 1,0 cm.....75

Figura 15 - Número médio de brotos por explante (A), e comprimento do maior broto (B) de *C. antisiphilitica* exposta a diferentes concentrações de BAP. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Segmentação de uma plântula de *C. antisiphilitica* com 30 dias de cultivo *in vitro* (C), segmento caulinar do primeiro par de folhas completamente expandido, contendo as duas gemas laterais utilizado nos experimentos de brotação (seta vermelha). Explante apresentando múltiplas brotações (D), brotações excisadas do explante original (E). Barras: 1,0 cm.....76

Figura 16 - Percentual de enraizamento de brotações (A) e comprimento da raiz principal (B) de *C. antisiphilitica* expostas a diferentes concentrações de auxinas. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam os diferentes reguladores de crescimento. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Brotação de *C. antisiphilitica* com 30 dias de cultivo *in vitro* disposta em meio de cultura MS com diferentes auxinas (C), explante enraizado (esquerda), com massa calogênica meio) e sem enraizamento (direita) (D). Barras: 1,0 cm.....77

Figura 17 - Aclimatização de brotações de *C. antisiphilitica* com e sem raízes dispostas em substrato comercial (A) ou vermiculita (B), em tubetes de 250 cm³ (C) e envoltas por embalagem plástica transparente, com palito de sustentação (D).....78

Figura 18 - Micrografias de secções paradérmicas da face abaxial de folhas de *C. antisiphilitica* cultivadas *in vitro* (A) e ao final da aclimatização (B) capturada por meio de fotomicroscópio com lente objetiva com aumento de 10x. Setas = estômatos.....79

Figura 19 - Percentual de formação de calos de diferentes tipos de explantes de *C. antisiphilitica* (A) submetidos a diferentes auxinas (B). Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada explante (A) e concentração (B), e letras minúsculas comparam dentro de cada regulador de crescimento. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).....94

Figura 20 - Curva de crescimento de calos de *T. roseoalba* (A) e de *C. antisiphilitica* (B). Amostras de calos de *T. roseoalba* (C) aos 5 dias (esquerda), 10 dias (centro) e 25 dias (direita) de cultivo *in vitro*. Barra: 1,0 cm.....95

Figura 21 - Distribuição de frequência para classificação visual da coloração dos calos (A), concentração de malonaldeído (MDA) (B) e absorbância de Formazan à 487 nm (C) em relação as diferentes colorações dos calos de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, ao final de 3 subcultivos de 30 dias. Barras: erro padrão da média. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Observação visual de calos brancos (esquerda), branco-amarronzados (centro) e marrons (direita) conforme análise de 3 avaliadores distintos (B). Barra: 1,0 cm96

Figura 22 - Percentual de área corada das lâminas com Carmin acético e azul de Evans (A) em relação as diferentes colorações dos calos de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, ao final de 3 subcultivos de 30 dias. Barras: erro padrão da média. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Campo capturado por meio do software AxioVision SE64 Rel.4.8 e analisado por dupla coloração de calo de coloração branca de *C. antisiphilitica* (B). Barra: 0,02 mm.....97

Figura 23 - Análise ultra-estrutural de calos de coloração branca de *T. roseoalba* (A e B) e de *C. antisiphilitica* (C e D) por meio de microscopia eletrônica de varredura.....98

Figura 24 - Viabilidade de sementes de *T. roseoalba* (Ipê-branco) e *C. antisiphilitica* (Ipê-verde) expostas à criopreservação, de acordo com Teste de Trazólio (A). Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.

Sementes de *T. roseoalba* (B) e sementes de *C. antisiphilitica* (C), submetidas à criopreservação (+NL) e mantidas em temperatura ambiente (-NL). Barras: 1 cm.....114

Figura 25 - Conteúdo de amido (A), aminoácidos (B) e açúcares solúveis totais (C) em plantas de *T. roseoalba* (D) e *C. antisiphilitica* (E), provenientes de sementes criopreservadas (+NL) e mantidas em temperatura ambiente (-NL). Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras dos gráficos: erro padrão da média. Barras da foto: 1 cm.....115

Figura 26 - Plantas de *T. roseoalba* provenientes de sementes criopreservadas (A) e tratamento controle (B), plantas de *C. antisiphilitica* provenientes de sementes criopreservadas (C) e tratamento controle (D).....116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização química do substrato comercial utilizado para aclimatização.....	44
Tabela 2 - Comprimento do maior broto (mm) de <i>T. roseoalba</i> com 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em relação ao tipo de citocinina e as diferentes temperaturas avaliadas para indução de brotações, independente da concentração.....	47
Tabela 3 - Comprimento do maior broto (mm) de <i>T. roseoalba</i> em relação à concentração de cada tipo de citocinina testada para indução de brotações.....	48
Tabela 4 - Percentual de sobrevivência (%) de explantes de <i>T. roseoalba</i> em relação a cada tipo de citocinina e a temperatura testada para indução de brotações, independente da concentração.....	48
Tabela 5 - Sobrevivência (%) de explantes de <i>T. roseoalba</i> em relação a cada tipo de citocinina e a sua concentração (mg.L ⁻¹) testada para indução de brotações.....	50
Tabela 6 - Percentual de sobrevivência (%) de plântulas de <i>T. roseoalba</i> com e sem enraizamento prévio e em dois substratos diferentes, durante o processo de aclimatização.....	53
Tabela 7 - Caracterização química do substrato comercial utilizado para aclimatização.....	71
Tabela 8 - Percentual de sobrevivência (%) de plântulas de <i>C. antisiphilitica</i> com e sem enraizamento prévio e em dois substratos diferentes.....	78
Tabela 9 - Grau de umidade (GU%), Germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN%) de <i>T. roseoalba</i> (Ipê-branco) e <i>C. antisiphilitica</i> (Ipê-verde) aos 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> , submetidas à criopreservação (+NL) e mantidas em temperatura ambiente (-NL). Número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca (MF) e massa seca (MS) por planta aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> , e o percentual de sobrevivência (S) ao final do processo de aclimatização.....	113
Tabela 10 - Alterações biométricas relacionadas à cor e geometria de sementes e plantas de <i>T. roseoalba</i> e <i>C. antisiphilitica</i> submetidas à criopreservação (+NL) e mantidas em temperatura ambiente (-NL).....	117

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	16
1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Família Bignoniaceae	19
2.2 <i>Tabebuia roseoalba</i> (Ipê-branco)	20
2.3 <i>Cybistax antisyphilitica</i> (Ipê-verde)	22
2.4 Micropropagação de espécies florestais	24
2.4.1 Organogênese direta	26
2.4.2 Embriogênese somática	28
2.5 Criopreservação	29
REFERÊNCIAS	31
SEGUNDA PARTE	37
ARTIGO 1 - Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia roseoalba</i> (Ridl.) Sandwith (Bignoniaceae)....	38
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1 Material vegetal e estabelecimento <i>in vitro</i>	40
2.2 Indução de brotações	41
2.3 Indução de raízes	42
2.4 Aclimatização	43
2.5 Análise estatística	45
3 RESULTADOS	45
4 DISCUSSÃO	54
5 CONCLUSÕES	61
ARTIGO 2 - Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Cybistax antisyphilitica</i> (Mart.) Martius (Bignoniaceae)	66
1 INTRODUÇÃO.....	66
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Material vegetal e estabelecimento <i>in vitro</i>	67
2.2 Indução de brotações	68
2.3 Indução de raízes	70

2.4 Aclimatização	70
2.5 Análise estatística	72
3 RESULTADOS	72
4 DISCUSSÃO	79
5 CONCLUSÕES	84
6 REFERÊNCIAS	84
ARTIGO 3 - Caracterização das massas calogênicas de <i>Tabebuia roseoalba</i> (Ridl.) Sandwith e	
<i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Martius (Bignoniaceae).....	87
1 INTRODUÇÃO.....	87
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1 Material vegetal e estabelecimento <i>in vitro</i>	89
2.2 Teste de explante para calogênese.....	90
2.3 Curva de crescimento dos calos.....	90
2.4 Classificação visual da coloração	91
2.5 Teste de viabilidade	91
2.6 Peroxidação lipídica	91
2.7 Análise histológica	92
2.8 Análise ultra-estrutural	92
2.9 Análise estatística	93
3 RESULTADOS	93
4 DISCUSSÃO.....	98
5 CONCLUSÕES	102
6 REFERÊNCIAS	102
ARTIGO 4 - Criopreservação de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i> (Ridl.) Sandwith e <i>Cybistax</i>	
<i>antisiphilitica</i> (Mart.) Martius (Bignoniaceae).....	106
1 INTRODUÇÃO.....	106
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	109
2.1 Material vegetal e beneficiamento de sementes	109
2.2 Criopreservação e inoculação das sementes.....	109
2.3 Teste de viabilidade	110
2.4 Germinação e crescimento inicial.....	111

2.5 Aclimatização e sobrevivência de plantas recuperadas	111
2.6 Análises bioquímicas	112
2.7 Avaliação biométrica	112
2.8 Análise estatística	113
3 RESULTADOS	113
4 DISCUSSÃO	117
5 CONCLUSÕES	122
6 REFERÊNCIAS	122

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura de tecidos vegetais compreende técnicas especialmente utilizadas para conservação e propagação vegetativa em larga escala, em particular para espécies de importância econômica, ornamental e medicinal (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; CAMERON, 2013). Em função da redução de populações, e da ameaça de extinção das espécies florestais nativas do Cerrado, é essencial o desenvolvimento de pesquisas para otimização de técnicas de conservação dos germoplasmas e multiplicação em larga escala (FREITAS et al., 2016; NAIDOO et al., 2016). Uma das vertentes da cultura de tecidos é a conservação *in vitro*, que consiste na manutenção de material biológico vivo em condições assépticas. Neste viés, para a conservação em longo prazo destaca-se a criopreservação, que consiste em conservar o material biológico em temperaturas ultrabaixas (-196 °C) e pode ser considerada uma alternativa promissora de conservação *ex situ*, por ser capaz de garantir a manutenção da integridade genética dos germoplasmas criopreservados por longos períodos de tempo (ENGELMANN, 2011).

Pertencentes à família Bignoniaceae, *Tabebuia roseoalba* (Ipê-branco) e *Cybistax antisyphilitica* (Ipê-verde) são árvores decíduas, de floração exuberante, as quais possuem potencial medicinal e grande valor ornamental, sendo por isso, muito utilizadas na arborização urbana e para recomposição vegetal de áreas degradadas (LORENZI, 2008; LOHMANN, 2015). Como plantas medicinais, *T. roseoalba* tem sido utilizada como anti-inflamatório pela medicina popular, e há estudos da aplicação do extrato etanólico de suas folhas para redução do ácido úrico do sangue (FERRAZ-FILHA et al., 2016). A partir do extrato da casca de *C. antisyphilitica* pode ser obtido o lapachol, um composto orgânico natural utilizado como inibidor do desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2005), e com atividade anticancerígena (GARKAVTSEV et al., 2011). Além disso, estas espécies são predominantes do Cerrado, o segundo maior bioma brasileiro em extensão, considerado o mais ameaçado do país, e um dos 34 hotspots ambientais mundiais, atualmente considerado como área crítica para conservação, o que justifica esforços para conservação e propagação destas espécies (MYERS et al., 2000).

Além da conservação, a crescente demanda por mudas de espécies florestais nativas do Cerrado para reflorestamento, evidencia a necessidade do desenvolvimento de protocolos que

otimizem sua produção, com alta qualidade morfofisiológica e capazes de atender às necessidades dos plantios (LELES et al., 2006). Contudo, em espécies florestais nativas do Cerrado é comum a ocorrência de sementes com baixa longevidade natural, o que dificulta sua utilização fora da época de produção (CARVALHO, SILVA, DAVIDE, 2006; SOUZA et al., 2017). Desta forma, as sementes de algumas espécies do gênero *Tabebuia*, apesar de serem produzidas em grandes quantidades, perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas em temperatura ambiente, mantendo-se por cerca de quatro a seis meses (DEGAN et al., 2001; CABRAL, BARBOSA, SIMABUKURO, 2003; OLIVEIRA et al., 2005; ABBADE e TAKAKI, 2014). Isto pode ser verificado em *T. roseoalba*, que apesar de produzir sementes em grande quantidade, estas apresentam curto período de viabilidade quando armazenadas em condições naturais (BORBA FILHO E PEREZ, 2009). Apesar disso, as sementes do gênero *Tabebuia* são geralmente consideradas ortodoxas quanto ao comportamento fisiológico que apresentam durante o armazenamento (GEMAQUE et al., 2005; SILVA et al., 2011). Desta forma, o estabelecimento de protocolos de propagação massiva de mudas, pode beneficiar programas de reflorestamento embasados no fornecimento constante de mudas de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*.

Para *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, não são conhecidos trabalhos envolvendo a seleção de indivíduos superiores para uso futuro em programas de melhoramento genético, e não há registro na literatura de protocolos completos que visem a sua conservação *in vitro*, bem como a sua multiplicação em larga escala. Desta forma, considerando a importância destas espécies, objetivou-se estabelecer um protocolo completo de multiplicação *in vitro* e criopreservação para *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, para conservação *ex situ* de germoplasma por longos períodos de tempo e produção de mudas saudáveis em larga escala, gerando novas perspectivas para o melhoramento genético, além de possibilitar a obtenção de clones de indivíduos de interesse, e para estimulação da produção comercial dessas espécies.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae Juss. constitui um importante grupo de plantas neotropicais, distribuídas desde o sudoeste dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Chile, sendo composta por aproximadamente 750 a 800 espécies e 110 gêneros, inseridos em oito tribos (SCUDELLER, 2004; GROSE e OLMSTEAD, 2007). Dentre os gêneros mais comuns destaca-se o *Tabebuia*, com cerca de 100 espécies, e representado por árvores pioneiras e lenhosas, como *T. roseoalba*.

Vale ressaltar que, originalmente, todas as espécies conhecidas como ipês eram incluídas no gênero *Tabebuia*, o qual foi criado em 1838 para abrigar as Bignoniáceas arbóreas de folhas simples, entretanto, este gênero sofreu inúmeras alterações ao longo da história (SANTOS, 2017). Posteriormente, as espécies de ipês foram divididas em dois gêneros, *Tabebuia* e *Handroanthus*, este último, especialmente criado para os representantes brasileiros (MATTOS, 1970).

Mais recentemente, o gênero *Tabebuia* foi novamente subdividido em três gêneros: *Tabebuia*, *Handroanthus* e *Roseodendron*, baseado em estudos filogenéticos, confirmando a existência de linhagens diferentes dentro do grupo (GROSE e OLMSTEAD, 2007). Desta forma, diferenças observadas no tamanho das pontuações intervasculares, na estratificação e largura dos raios, bem como na espessura da parede das fibras permitiram a permanência de *T. roseoalba* no gênero *Tabebuia*. Contudo, para o gênero *Cybistax*, na flora brasileira, o único representante é denominado *Cybistax antisiphilitica* (SILVA e QUEIROZ, 2003).

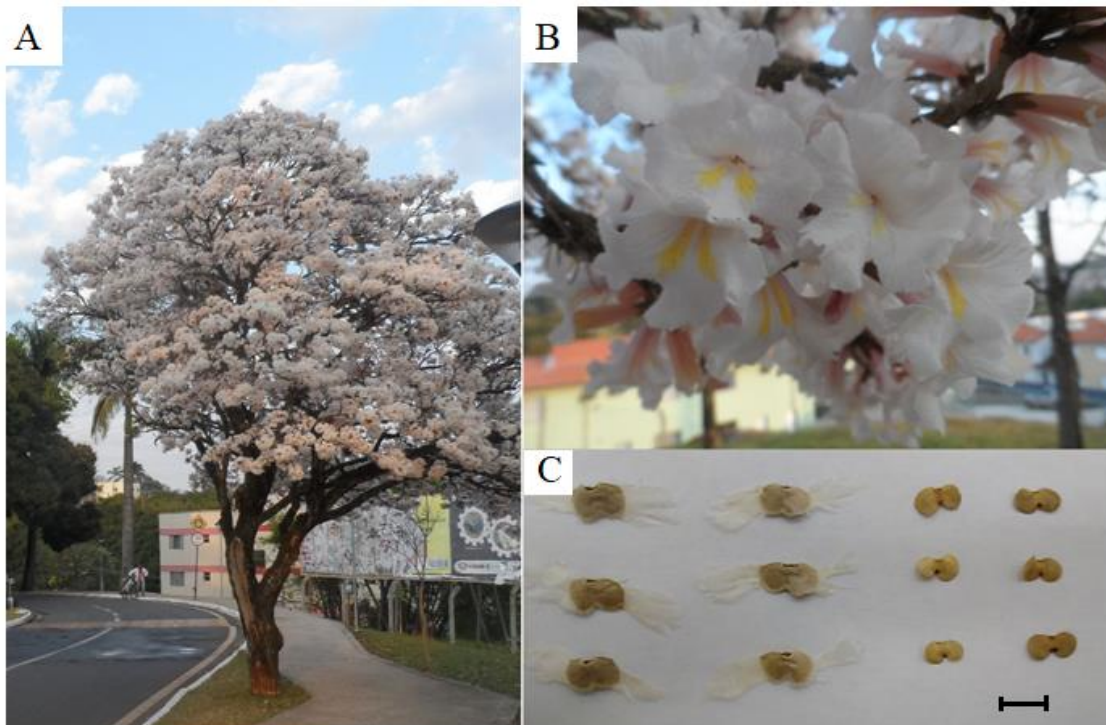
De maneira geral, a floração destas árvores é muito vistosa, sendo suas flores geralmente grandes, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras e de simetria zigomorfa. O fruto é capsular seco, loculicida ou septícida, raramente indeiscentes, e apresentam sementes aladas (LORENZI, 2008). As sementes de algumas espécies do gênero *Tabebuia*, são consideradas ortodoxas quanto ao comportamento fisiológico que apresentam durante o armazenamento (GEMAQUE et al., 2005; SILVA et al., 2011). Contudo, sementes de *T. roseoalba*, apresentam período de viabilidade relativamente curto em condições naturais (BORBA FILHO e PEREZ, 2009).

O curto período de armazenamento das sementes deste gênero se deve a pequena quantidade de substâncias de reserva, que normalmente são consumidas com a respiração no seu armazenamento. Como exemplo disso pode-se mencionar as sementes de *T. roseoalba* que apresentam elevado teor de óleo, cerca de 18,6%, em sua composição química, o que determina maior instabilidade em relação a sementes com reservas a base de proteínas e carboidratos (DEGAN et al., 1997). Contudo, na literatura são escassos os estudos envolvendo o processo de desenvolvimento e maturação das sementes dos gêneros *Tabebuia* e *Cybistax* que possam elucidar aspectos relacionados a sua germinação e conservação (SILVA et al., 2011).

2.2 *Tabebuia roseoalba* (Ipê-branco)

Dentre as espécies nativas do Brasil mais cultivadas, *Tabebuia roseoalba* (Ridley) Sandwith, pertencente à família Bignoniaceae, destaca-se pela produção de flores brancas muito vistosas (MAEDA e MATTHES, 1984), como pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1 - Aspecto visual de uma planta adulta em pleno florescimento localizada no campus da UFLA-MG (A), ramo com flores (B), e sementes com alas (esquerda) e sem alas (direita) (C) de *T. roseoalba*. Barra: 1 cm.



Fonte: Do Autor (2015).

Trata-se de uma espécie florestal nativa do Cerrado brasileiro, região com precipitação média anual de 1.000 mm a 2.100 mm, com verão chuvoso e período de 3 a 5 meses de déficit hídrico, e que tolera temperaturas médias anuais de 24 °C a 31 °C. Sua madeira é frequentemente explorada para construção civil e naval devido sua superfície lustrosa, além de ser pesada, macia e apresentar alta durabilidade (LORENZI, 2008; PACE et al., 2015). É uma árvore decídua, que floresce anualmente entre os meses de agosto e novembro, com frutos deiscentes do tipo síliqua amadurecendo entre outubro e dezembro, que liberam grande quantidade de sementes (LORENZI et al., 2008).

As sementes são achatadas, possuem formato levemente abaulado, oblongo, são aladas e unitegmentadas. Externamente, distingue-se o corpo, que se encontra na posição central e as alas, que são uma expansão, principalmente lateral, do tegumento. O embrião é reto, representado, em sua maior parte, pelos cotilédones e está revestido por uma membrana delgada. O eixo hipocótilo-radicular é cilíndrico e pequeno, disposto mediana e verticalmente entre os dois cotilédones (COSTA et al., 2004; LORENZI et al., 2008). Além disso, é sabido que aproximadamente 80% das sementes de *T. rosealba* são parasitadas por fungos do gênero *Fusarium*, um patógeno causador de danos tanto nas sementes em germinação como em plântulas (DEGAN et al. 1997).

Além de ser utilizada na construção civil e naval, *T. rosealba* também apresenta aplicação na medicina popular como anti-inflamatório e para redução do ácido úrico do sangue (FERRAZ-FILHA et al., 2016). Contudo, a espécie é principalmente utilizada no paisagismo devido seu florescimento exuberante, e na restauração de terrenos secos, arenosos e pedregosos devido à sua fácil adaptação (LORENZI, 2008). Mesmo diante da importância paisagística e do potencial medicinal dos ipês, a intensificação do desmatamento e destruição de áreas florestais tem reduzido as populações destas árvores (KLINK E MACHADO, 2005), o que justifica esforços para conservação e propagação desta espécie. Neste sentido, a preocupação crescente quanto à preservação da diversidade vegetal pode ser percebida no estado de Minas Gerais, onde esforços têm sido feitos para conservar o Ipê-amarelo, por meio da Lei nº 9.743, de 15 de dezembro de 1988 (MINAS GERAIS, 1988), que o declara de interesse comum, de preservação permanente e imune de corte no Estado, sinalizando a importância destas árvores e a necessidade de esforços para sua perpetuação e propagação.

Por sua relevância, alguns trabalhos pontuais já foram realizados a fim de conservar e propagar *T. roseoalba* por meio de técnicas de cultura de tecidos. Abbade et al. (2009) compararam a estrutura interna e externa de folhas de *T. roseoalba* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, e verificaram que folhas de plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram menor densidade estomática e maior número de tricomas, que plantas cultivadas *in vitro*. Além disso, os mesmos autores avaliaram a germinação desta espécie em diferentes condições (*in vitro* e *ex vitro*) e recomendaram a utilização de meio de cultura MS suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ de GA₃ ou de 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃ em meio de cultura MS½, para germinação de 88% e 80%, respectivamente (ABBADÉ et al., 2010). Em outro estudo, Abbade et al, (2010) determinaram a curva de crescimento de calos de *T. roseoalba*, com comportamento sigmoidal, bem como a sua caracterização bioquímica.

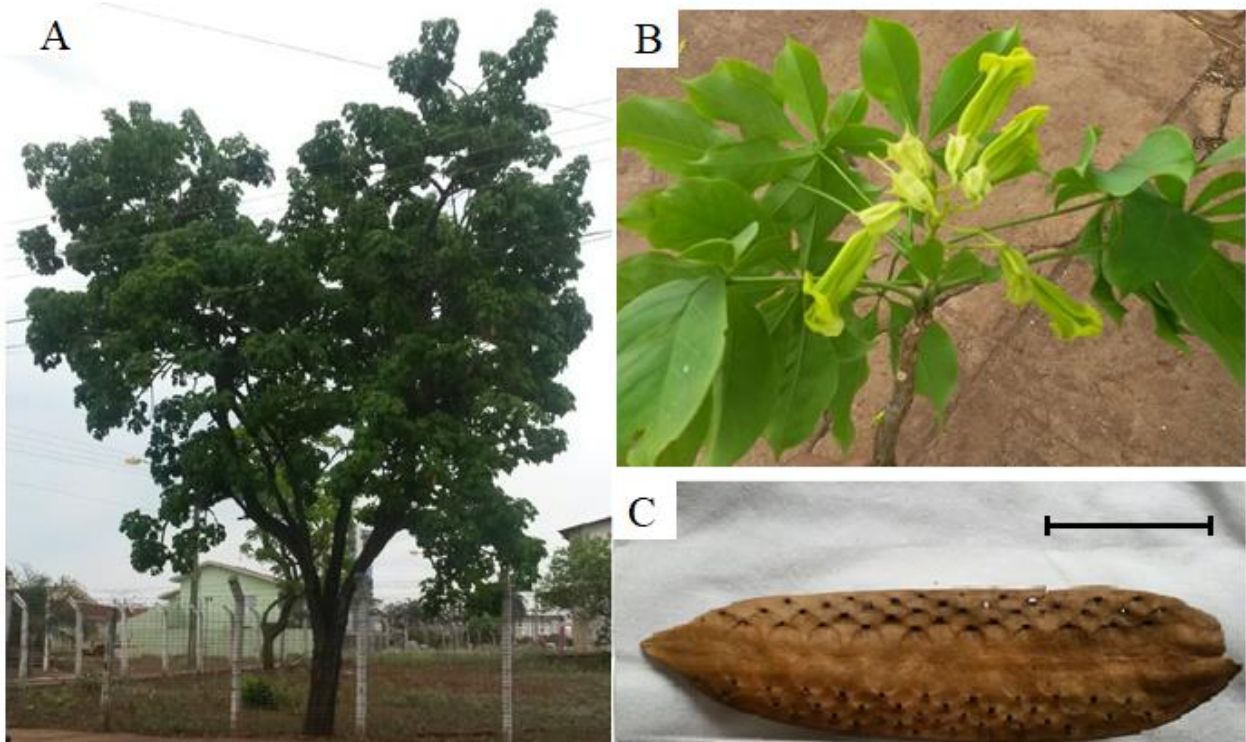
Mais adiante, Reis et al. (2013) encontraram calos com potencial embriogênico provenientes de folhas cotiledonares cultivadas *in vitro*, em exposição ao regulador de crescimento α -naftalenoacético (ANA). Além disso, Porto et al. (2014) compararam a estrutura anatômica entre folhas de plântulas germinadas *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos, e verificaram que as plântulas aclimatizadas com substrato comercial apresentaram-se maiores, com maior espessura dos parênquimas paliádico e esponjoso. Já para fins de conservação *ex vitro*, foi avaliada a viabilidade de sementes desta espécie em função do tempo de armazenamento, verificando-se uma queda acentuada do percentual de germinação, além do comprimento e do peso de matéria seca das plântulas a partir de 6 meses de armazenamento (ABBADÉ e TAKAKI, 2014).

2.3 *Cybistax antisiphilitica* (Ipê-verde)

Pertencente à família Bignoniaceae, *Cybistax antisiphilitica* (Martius) Martius (Figura 2) é uma espécie arbórea, que possui de 6 a 12 metros de altura e tronco de 30 a 40 cm de diâmetro com ritidoma acinzentado e espesso, e com fissuras longitudinais sinuosas. Suas folhas são compostas e digitadas, com cinco a sete folíolos, sustentadas por pecíolo de 15 a 20 cm, as inflorescências são formadas em panículas terminais e as flores têm pétalas verdes tubulosas, unidas na base. Os frutos são síliquas lenhosas deiscentes com arestas, apresentando um septo central (repl), onde as sementes membranáceas e aladas se fixam (LORENZI, 2008).

A espécie produz grande quantidade de sementes, que não apresentam dormência e dispersam-se com aproximadamente 10% de teor de água, levando até 26 dias para germinarem em ambiente natural (FREITAS, SANTANA, CAMARGO, 2012). Contudo, poucos trabalhos foram feitos a fim de caracterizar sua germinação, de forma que em condições de laboratório, as sementes apresentam entre 53% e 56,6% de germinação (SANTOS et al., 1998). Desta forma, devido a sua relevância, já foram determinados os efeitos do acondicionamento a vácuo de sementes, de forma que não houve variação no percentual de germinação (entre 83% e 90%), em relação ao tempo de armazenamento, contudo o percentual de emergência, bem como de formação de plântulas normais foram reduzidos a taxas de 4,3% e 3,02%, respectivamente, por mês (FREITAS et al., 2012).

Figura 2 - Aspecto visual de uma planta adulta de *C. antisiphilitica* localizado no município de Jataí - GO (A), ramo com flores (B), e fruto lenhoso fechado do tipo síliqua (C). Barra: 5 cm.



Fonte: Daniela Nogueira (2015).

Há grande ocorrência de *C. antisiphilitica* no Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal brasileiros, contudo, por se tratar de uma espécie pioneira, sua presença no interior de florestas

densas é rara. Está bem adaptada a solos arenosos e pedregosos com drenagem rápida e por isso é muito indicada para reflorestamento e recomposição vegetal de áreas de preservação permanentes. Além disso, é uma árvore comumente indicada para projetos paisagísticos e arborização urbana, devido a seu porte mediano e coloração distinta de suas flores. A madeira é pouco resistente, embora seja utilizada na carpintaria e para construção naval. Apresenta casca grossa com ranhuras e folhas opostas compostas digitadas, que são frequentemente utilizadas pela medicina popular, para tratamento de infecções urinárias, úlcera, blenorragia e sífilis, de onde originou seu nome (LORENZI, 2008; PINTO et al., 2013).

Alguns metabólitos dessa espécie já foram identificados e caracterizados, como é o caso dos triterpenos, que apresentam atividade antimicrobiana das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (RAMOS et al., 2003). Além disso, o lapachol, um composto orgânico da classe das naftoquinonas, pode ser extraído da sua casca, e utilizado para inibição do desenvolvimento de larvas do mosquito *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2005), além de apresentar atividade anticancerígena (GARKAVTSEV et al., 2011). Neste sentido, plantas que produzem tais compostos bioativos são frequentemente exploradas de forma predatória e indiscriminada, e, por este motivo, pesquisas visando sua multiplicação, e a produção em larga escala destes metabólitos secundários, são vantajosas tanto do ponto de vista ecológico, como econômico (FUMAGALI et al., 2008). Diante do exposto, a biotecnologia vegetal, por meio de técnicas de cultura de tecidos, pode ser uma importante ferramenta para os estudos de conservação e propagação da espécie, que são escassos na literatura para *C. antisiphilitica*.

2.4 Micropropagação de espécies florestais

O cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais compreende um conjunto de técnicas biotecnológicas em que um explante é isolado e cultivado sob condições assépticas, em um meio nutritivo artificial (SOUZA et al., 2017). Esta ferramenta vem sendo amplamente utilizada pela alta qualidade fitossanitária das plantas produzidas, em curto espaço de tempo, espaço físico reduzido, independente da época do ano, e pela possibilidade de manutenção e conservação da identidade genética dos indivíduos (KELLER et al., 2013; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; CAMERON, 2013). Possibilita também, o emprego de tecnologias de conservação, produção de sementes sintéticas, criopreservação, e produção de biomassa para

extração de fitofármacos em espécies com potencial medicinal (ALMEIDA et al., 2016). Desta forma, métodos de propagação vegetal *in vitro* podem ser aplicados para conservação e multiplicação em larga escala das espécies em estudo (*T. roseoalba* e *C. antisyphilitica*), devido a sua relevância paisagística e ornamental, e também por seu potencial medicinal.

Quando se busca a regeneração de tecidos específicos ou de plantas inteiras, quer seja por organogênese ou por embriogênese, é necessária a adequação de protocolos específicos para cada tipo de material vegetal (PINHAL et al., 2011, XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; CAMERON, 2013). Espécies lenhosas como *T. roseoalba* e *C. antisyphilitica* apresentam algumas limitações para micropropagação como a grande variabilidade genética existente em plantas nativas, dificuldade de crescimento e diferenciação dos seus tecidos *in vitro* (DUTRA, WENDLING, BRONDANI, 2009).

Para superar tais obstáculos, são necessários estudos mais específicos para desenvolvimento de metodologias e protocolos que atendam às exigências de cada espécie. Neste sentido, o processo de micropropagação vegetal pode passar pela organogênese *in vitro* (LIU e PIJUT, 2008), ou pela calogênese, seguida de organogênese ou embriogênese somática (SANTOS et al., 2010). Dessa forma, a multiplicação *in vitro* constitui uma alternativa promissora em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas, pois eleva a taxa de multiplicação e propagação clonal, o que possibilita a propagação vegetativa de genótipos específicos, de alta relevância (OLIVEIRA, DIAS, BRONDANI, 2013).

As poucas informações bibliográficas sobre a multiplicação *in vitro* para a família Bignoniaceae, estão limitadas a estudos pontuais e específicos de determinadas espécies. Como exemplo pode-se citar a germinação *in vitro* e *ex vitro* de *T. serratifolia* (Vahl) Nich e um protocolo de indução de brotações adventícias para *T. donnell-smithii* (DOUSSEAU et al., 2008). Estudos mais recentes tratam de etapas específicas da organogênese *in vitro*, como por exemplo, a rizogênese *in vitro* de *H. impetiginosus* (LARRABURU e LLORENTE, 2015) e o efeito do ágar na rizogênese e aclimatização de *H. chrysotrichus* (RABAIOLLI et al., 2017). Outros estudos apresentam protocolos mais elaborados de propagação *in vitro* para conservação das espécies como a organogênese *in vitro* em *H. serratifolius* (SOUZA et al., 2017), a micropropagação de *T. rosea* Bertol DC (PADRON et al., 2006), a multiplicação *in vitro* de *H. chrysotrichus* (PEREIRA et al., 2015), a micropropagação de *H. impetiginosus* (LARRABURU,

APÓSTOLO, LLORENTE, 2012) e de *H. heptaphyllus* (Vell.) Mattos (DUARTE, SANSBERRO, LUNA, 2016).

2.4.1 Organogênese direta

A proliferação de gemas axilares é a técnica mais utilizada para a micropropagação de plantas lenhosas devido a manipulação relativamente fácil, tamanho do explante utilizado, e por originar plantas geneticamente mais estáveis (CAMERON, 2013). Contudo, para elaboração de um protocolo de propagação vegetal *in vitro* por meio de organogênese direta é preciso ter sucesso de todas as fases, iniciando pela fase de estabelecimento *in vitro*, multiplicação, alongamento (pode não ser necessária), enraizamento e, por fim, aclimatização (XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; CAMERON, 2013; PEREIRA, NAVROSKI, REINIGER, 2015). Cada uma dessas fases é influenciada por fatores como genótipo, estado fisiológico da planta matriz, seleção, coleta e tipo de explante, procedimento de assepsia utilizado, meio de cultura, e das concentrações e tipos de reguladores de crescimento aplicados (GEORGE, HALL, DE KLERK, 2008).

Para obtenção das plantas matrizes, geralmente a semente é germinada *in vitro*, ou seja, em condições assépticas, de modo que a plântula resultante possa ser fonte confiável de explante. Os protocolos de assepsia mais comumente utilizados para sementes de espécies arbóreas florestais nativas, envolvem especialmente o hipoclorito de sódio (NaOCl) (SOUZA et al., 2017). Além disso, na germinação e estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, o ácido giberélico (GA_3) é comumente recomendando, uma vez que desempenha importante função associada com a germinação e controle da hidrólise das reservas (FRANCO e FERREIRA, 2002; ABBADE et al., 2009; SOUZA et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Posteriormente, é preciso maximizar a multiplicação de gemas por meio da suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento específicos para a morfogênese *in vitro* (ERIG et al., 2002). Desta forma, a organogênese *in vitro* ocorre com a formação de gemas adventícias ou raízes, de forma direta ou indireta, dependendo da formação ou não de calos, respectivamente (XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Para o sucesso da multiplicação *in vitro*, é frequentemente recomendado o uso de citocininas, contudo é necessário determinar o melhor tipo, bem como a sua concentração (SOARES et al., 2014). Neste sentido, a

indução de brotos em explantes pode ser realizada por meio da aplicação exógena de citocininas como 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), thidiazuron (TDZ) e isopenteniladenina (2iP), promovendo o desenvolvimento das gemas axilares dormentes, e propiciando a formação e proliferação de novas brotações (CAMERON, 2013; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; SOARES et al., 2014).

Subsequentemente à indução de brotações, o enraizamento é fundamental para a obtenção de plantas em boas condições para transferência ao ambiente *ex vitro*, ou que sejam melhor aclimatizadas. Desta forma, a formação de raízes adventícias nas brotações ou partes aéreas obtidas durante o estágio de multiplicação, permite a constituição de plantas completas. No entanto, muitas vezes as raízes formadas não apresentam características adequadas às funções de absorção, ocasionando, dentre outros fatores, a morte das mudas, quando transferidas para o solo ou substrato (SOUZA e PEREIRA, 2007; ROCHA et al., 2008). No processo de rizogênese *in vitro*, especialmente para plantas lenhosas, as auxinas ácido indol-3-acético (AIA), ácido indolil-3-butírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), α -naftalenoacético (ANA) e ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico (Dicamba), são as mais utilizadas (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009).

A rizogênese é um processo complexo que envolve fatores intrínsecos (fisiológicos e bioquímicos) e extrínsecos inerentes ao meio de cultura e condições climáticas impostas pela sala de crescimento (SOUZA e PEREIRA, 2007; ROCHA et al., 2008). As auxinas são os reguladores de crescimento mais comumente utilizados na expansão, alongamento e divisão celular durante a rizogênese. Dentre as auxinas, o AIB tem sido mais utilizado para a indução de raízes adventícias em explantes, devido a sua maior fotoestabilidade, além do custo reduzido (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009; SOARES et al., 2014). No entanto, a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* é desejável sob o aspecto econômico, pois o período em que a muda permanece na sala de cultura, a mão-de-obra utilizada e os gastos com energia elevam o custo da muda micropropagada (BOSA et al., 2003).

A passagem das plantas desenvolvidas *in vitro* para o ambiente *ex vitro* é denominada de aclimatização. Esta é uma etapa crítica da micropropagação e pode chegar a ser um desafio limitante de todo o processo, por isso deve ocorrer de maneira gradativa (ROCHA et al., 2008; PINHAL et al., 2011; HARTMANN et al., 2011). Durante esse processo, as plantas são expostas a mudanças bruscas nas condições ambientais, devido à transferência de um ambiente *in vitro*

extremamente úmido para o meio externo seco. Nesta situação, as plantas precisam desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática, para evitar a perda de água pelas células, além de aumentar a taxa fotossintética (ROCHA et al., 2008; HARTMANN et al., 2011). Portanto, deve-se proporcionar alta umidade relativa do ar, baixa irradiação, temperatura amena, bem como avaliar o melhor tipo de substrato, para uma melhor resposta ao processo de aclimatização (SCHUCH, 2005).

2.4.2 Embriogênese somática

As células vegetais apresentam grande capacidade de se diferenciar ou se desdiferenciar durante o desenvolvimento do organismo e ciclo de vida vegetal (AGRAWAL e SARDAR, 2007). Neste sentido, outra técnica da cultura de tecidos é a embriogênese somática, onde células somáticas se diferenciam em embriões, assemelhando-se morfológicamente ao processo que ocorre com os embriões zigóticos, e pode ser aplicada para conservação e propagação *in vitro* de espécies de interesse (CAMERON, 2013; FEHÉR, 2015).

O processo de embriogênese somática *in vitro* pode ocorrer de forma direta, no qual os embriões originam-se dos tecidos-matrizes, sem a formação de estádios intermediários de calos, ou indireta, no qual os embriões se formam a partir de calos, que apresentam diferentes estádios de diferenciação (CAMERON, 2013; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; FEHÉR, 2015). Em ambos os tipos de embriogênese somática, o processo se inicia com a transição de células somáticas para o estado embriogênico, podendo ser induzida por certas condições *in vitro* (FEHÉR, 2015). Neste sentido, é necessário chegar ao balanço ideal entre fatores como reguladores de crescimento, potencial osmótico, pH, aminoácidos, sais e vitaminas, e todo esse processo é bastante específico, além de demandar tempo e mão de obra qualificada (JIMÉNEZ, 2001; GEORGE, HALL, DE KLERK, 2008; CARNEIRO et al., 2014).

Em estudos de embriogênese somática são necessários estudos de fontes de explantes, bem como tipo e concentração de reguladores de crescimento. Neste sentido, as auxinas, principalmente o α -naftalenoacético (ANA) e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), estão diretamente envolvidas na indução e na iniciação de embriões somáticos, e na formação dos calos embriogênicos (REIS et al., 2013; FEHÉR, 2015). O calo embriogênico é formado por uma massa pró-embriogênica, e em seguida pela formação do embrião somático. Subsequentemente, a

maturação destes embriões geralmente ocorre em meio de cultura suplementado com reguladores de crescimento como o ácido abscísico (ABA) e o ácido giberélico (GA₃), ou com redução do potencial osmótico, dessecação e regeneração da planta. Deste modo, uma série de tratamentos químicos e físicos devem ser aplicados no momento apropriado para indução dos calos embriogênicos (AGRAWAL e SARDAR, 2007). Diante do exposto, a micropropagação pode ser considerada uma alternativa de conservação *ex situ*, por permitir a propagação e manutenção *in vitro* da biodiversidade de diferentes espécies, por meio do cultivo *in vitro* e também da criopreservação (FREITAS et al., 2016).

2.5 Criopreservação

Com a crescente perda de recursos genéticos e a degradação dos ecossistemas naturais em todo o mundo, esforços contínuos devem ser feitos para que o máximo de material genético de relevância atual ou potencial seja conservado para as gerações futuras (PIJUT et al. 2012; WESLEY-SMITH et al., 2015), em especial, as espécies nativas do Cerrado, como *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*.

Dentre as técnicas de conservação *ex situ* em longo prazo destaca-se a criopreservação, que consiste em conservar o material biológico em temperaturas ultrabaixas (-196 °C). Estas condições não permitem a ocorrência de reações metabólicas dirigidas termicamente, e garante a viabilidade do armazenamento do material biológico sem que este sofra alterações genéticas, durante longos períodos de tempo (ENGELMANN, 2011; NAIDOO et al., 2016). Na criopreservação, o germoplasma criopreservado é mantido em pequenos espaços, fica protegido de contaminação, e requer manutenção mínima (FOLGADO et al., 2015). Além disso, o custo do armazenamento em bancos criogênicos é menor ao longo dos anos quando comparado a outros sistemas de conservação de recursos genéticos, como no armazenamento em campo, e a conservação *in vitro* por crescimento lento (DULLOO et al., 2009; ENGELMANN, 2011).

A criopreservação é uma técnica de conservação que pode ser aplicada para diferentes tipos de explantes, como embriões zigóticos (WEN et al., 2012; LOPES et al., 2013), embriões somáticos (FREITAS et al., 2016), ápices caulinares (POPOVA et al., 2010), meristemas (PANIS e LAMBARDI, 2006), suspensões celulares (ISHIKAWA et al., 2006) e sementes (HIRANO et al., 2005; SOUZA et al., 2015). No entanto, a determinação de um protocolo de criopreservação

geralmente exige a otimização de muitas variáveis como o tamanho da amostra, tipo e concentração de crioprotetores (quando necessários) e do teor de água da amostra durante congelamento e descongelamento (BEKHEET et al., 2007).

Desta forma, o sucesso desta técnica depende da prevenção de danos letais às membranas e organelas celulares, que estão associados às características de conteúdo de água durante o congelamento e a conformação de cristais de gelo dentro das células, os quais podem causar danos irreversíveis (WESLEY-SMITH et al., 2015). Os danos comumente observados resultantes da formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação incluem rupturas nas paredes e membrana plasmática, com extravasamento de material citoplasmático e ruptura do envelope nuclear (WEN et al., 2012).

Esta técnica vem se mostrando com alta aplicabilidade para sementes, ápices caulinares, gemas laterais e embriões somáticos, especialmente para espécies florestais nativas do Cerrado (SOUZA et al., 2015; PRUDENTE et al., 2015; FREITAS et al., 2016). Diante do exposto, o sucesso da criopreservação para conservação de espécies de interesse geralmente depende da otimização e adaptação dos protocolos, como dessecação das células antes da imersão em nitrogênio líquido, reaquecimento e regeneração dos explantes (WESLEY-SMITH et al., 2015; FREITAS et al., 2016). Exemplo deste tipo de conservação pode ser visto em estudos de criopreservação de sementes e embriões zigóticos de *H. serratifolius* (Ipê-amarelo), onde foi obtido 95% de germinação das sementes após criopreservação, e com 1 minuto de descongelamento, à 38 °C (SOUZA et al., 2015).

Diante do exposto, além da multiplicação *in vitro*, a criopreservação de sementes se torna uma ferramenta promissora para criação de bancos de germoplasma, em que o material vegetal criopreservado estará prontamente disponível para ser regenerado, a um baixo custo, facilitando o intercâmbio de material biológico e reduzindo a erosão genética (RAVEN e HAVENS, 2014; FREITAS et al., 2016). Este estudo poderá contribuir para a conservação das espécies, permitindo a manutenção de programas de reflorestamento com *T. rosealba* e *C. antisyphilitica*, assegurando a variabilidade genética, e a possibilidade de utilização deste material em qualquer época do ano.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. V. S. et al. As plantas medicinais e a micropropagação como ferramenta para sua expansão e utilização. **Revista Textura**, v. 9, n. 16, p. 1-14, 2016.
- ABBADE, L. C. et al. Anatomia foliar de Ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand.) Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.
- ABBADE, L. C. et al. Growth curve and biochemical analyses of callus of Ipe-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, v. 33, p. 45-56, 2010.
- ABBADE, L. C. et al. Germinação de sementes de ipê-branco em diferentes substratos e meios de cultura. **Magistra**, v. 22, p. 162-167, n. 3-4, 2010.
- ABBADE, L. C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith-Bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. **Revista Árvore**, p. 233-240, 2014.
- AGRAWAL, V.; SARDAR, P. R. *In vitro* regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 6, p. 585-592, 2007.
- BEKHEET, S. A. et al. Application of cryopreservation technique for *in vitro* grown date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultures. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 9, p. 859-866, 2007.
- BORBA FILHO, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. D. Armazenamento de sementes de Ipê-branco e Ipê-roxo em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 259-269, 2009.
- BOSA, N. et al. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 207-210, 2003.
- CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. D. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 609-617, 2003.
- CAMERON, G. **Tissue culture technique**. Academic Press, 2013.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.

COSTA, M. E. et al. Polyembryony and aspects of embryogenesis in *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 395-406, 2004.

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**, v. 3, n. 1, p. 41-47, 1997.

DEGAN, P. et al. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 492-496, 2001.

DOUSSEAU, S. et al. Leaf anatomy of *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagated *in vitro*, *in vivo* and during the acclimatization. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.

DUARTE, E.; SANSBERRO, P.; LUNA, C. Micropropagation of *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos from seedling explants. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 25, p. 1292-1298, 2016.

DULLOO, M. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, 2009.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 49-59, 2009.

ENGELMANN, F. Cryopreservation of embryos: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 710, p. 155-184, 2011.

ERIG, A. C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G. R. D. L. 6-benzylamino purine and indol butyric acid on the *in vitro* multiplication of blackberry (*Rubus idaeus*), cv. Tupy. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis-stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FERRAZ-FILHA, Z. S. et al. *Tabebuia roseoalba*: *In vivo* hypouricemic and anti-inflammatory effects of its ethanolic extract and constituents. **Planta Medica**, v. 82, n. 16, p. 1395-1402, 2016.

FOLGADO, R. et al. Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 432-441, 2015.

FRANCO, E. T. H.; FERREIRA, A. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2002.

FREITAS, R. T. et al. Cryopreservation of *Coffea arabica* L. zygotic embryos by vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 2, p. 445-451, 2016.

FREITAS, M. N.; SANTANA, D. G.; DE CAMARGO, R. Conservação de sementes de Ipê-verde (*Cybistax antisyphilitica* Mart.) por armazenamento a vácuo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 4, p. 142-148, 2012.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GARKAVTSEV, I. et al. Dehydro-alpha-lapachone, a plant product with antivasculature activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A.**, v. 108, n. 28, p. 11596-115601, 2011.

GEMAQUE, R. C. R. et al. Efeito das secagens lenta e rápida em sementes de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, v. 11, n. 4, p. 329-335, 2005.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In: *Plant propagation by tissue culture*. **Springer Netherlands**, p. 65-113, 2008.

GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s.l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, v. 32, n. 3, p. 660-670, 2007.

HIRANO, T. et al. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 8, p. 534-539, 2005.

ISHIKAWA, M. et al. Effect of growth phase on survival of bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. **Annals of Botany**, v. 97, n. 3, p. 453-459, 2006.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

KELLER, E. J. et al. Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 3, p. 913-926, 2013.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LARRABURU, E. E.; APÓSTOLO, N. M.; LLORENTE, B. E. *In vitro* propagation of pink lapacho: response surface methodology and factorial analysis for optimisation of medium components. **International Journal of Forestry Research**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

LARRABURU, E. E.; LLORENTE, B. E. *Azospirillum brasilense* enhances *in vitro* rhizogenesis of *Handroanthus impetiginosus* (pink lapacho) in different culture media. **Annals of forest science**, v. 72, n. 2, p. 219-229, 2015.

- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.
- LELES, P. S. S. et al. Qualidade de mudas de quatro espécies florestais produzidas em diferentes tubetes. *Floresta e Ambiente*, v. 13, n. 1, p. 69-78, 2006.
- LIU, X.; PIJUT, P. M. Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, n. 2, p. 113-123, 2008.
- LOHMANN, L. G. Bignoniaceae in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 2, 2015.
- LOPES, K. P. et al. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4a edição. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, v. 1, p. 384, 2008.
- MAEDA, J. A.; MATTHES, L. A. F. Conservation of "ipê" seeds. **Bragantia**, v. 43, n. 1, p. 51-61, 1984.
- MATTOS, J. R. D. *Handroanthus*, um novo gênero para os "ipês" do Brasil. **Loefgrenia**, v. 50, n. 2, p. 1-4, 1970.
- MINAS GERAIS. **Lei nº 9.743, de 15 de dezembro de 1988**. Declara de interesse comum, de preservação permanente e imune de corte o Ipê-amarelo, e dá outras providências, 1988.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NAIDOO, C. et al. The role of reactive oxygen species and antioxidants during precooling stages of axis cryopreservation in recalcitrant *Trichilia dregeana*. **Botany**, v. 94, n. 5, p. 391-403, 2016.
- NIINO, T. et al. Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryo-plate. **Plant Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 281-287, 2014.
- OLIVEIRA, L M. et al. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex AP de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich.- Bignoniaceae. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 642-648, 2005.
- PACE, M. R. et al. Wood anatomy of major Bignoniaceae clades. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 3, p. 967-995, 2015.
- PADRON, I. E. S. et al. Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). **Temas Agrarios**, v. 11, n. 2, p. 52-62, 2006.

- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The role of biotechnology**, p. 61-78, 2006.
- PEREIRA, M. D. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex a. dc.) Mattos. **Nativa**, v. 3, n. 1, p. 59-63, 2015.
- PIJUT, P. M. et al. *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species-A review (2001-2011). **Propagation of Ornamental Plants**, v. 12, n. 1, p. 25-51, 2012.
- PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
- POPOVA, E.; KIM, H.-H.; PAEK, K.-Y. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 4, p. 522-528, 2010.
- PORTO, J. M. P. et al. Anatomical analyses of *Tabebuia roseoalba* (Bignoniaceae) seedlings during acclimatization process. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 8, n. 7, p. 257-264, 2014.
- PRUDENTE, D. D. O. et al. *In vitro* germination and cryopreservation of *Zinnia elegans* seeds. **Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 2, p. 243-250, 2015.
- RABAIOLLI, S. M. S. et al. Agar does not affect *in vitro* rhizogenesis and ex vitro acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. **Cerne**, v. 23, n. 2, p. 185-192, 2017.
- RAMOS, M. P. P. et al. Computer-aided identification of chemical constituents isolated from *Cybistax antisyphilitica*. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, v. 2, p. 000-000, 2003.
- RAVEN, P.; HAVENS, K. *Ex situ* plant conservation and cryopreservation: breakthroughs in tropical plant conservation. **International Journal of Plant Sciences**, v. 175, n. 1, p. 1-2, 2014.
- REIS, M. et al. Cytochemical and ultrastructural analysis of pro-embryogenic masses in *Tabebuia roseoalba*. **Acta Horticulturae**, v. 988, p. 186-213, 2013.
- ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 769-774 2008.
- RODRIGUES, A. M. S. et al. Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p. 755-757, 2005.
- SANTOS, A.; BRAGA, T. Cryopreservation of seeds of barbatimão with different water contents. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 8, n. 13, p. 250-256, 2014.
- SANTOS, D. N. D. et al. Análise bioquímica de calos de pinhão-mansão. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, 2010.

- SANTOS, M. et al. Avaliação da qualidade sanitária e fisiológica das sementes de caroba (*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, p. 1-6, 1998.
- SANTOS, S. R. D. A atual classificação do antigo gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae), sob o ponto de vista da anatomia da madeira. **Balduinia**, n. 58, p. 10-24, 2017.
- SCHUCH, A. C. E. M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, 2005.
- SCUDELLER, V. V. Bignoniaceae Juss. no Parque Nacional da Serra da Canastra-Minas Gerais, Brasil. **Iheringia, série Botânica**, v. 59, p. 59-73, 2004.
- SILVA, D. G. et al. Physiological and biochemical properties changes during storage of *Tabebuia serratifolia* seeds. **Cerne**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2011.
- SILVA, M. D.; QUEIROZ, L. D. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 3, n. 1/2, p. 3-21, 2003.
- SOARES, T. D. C. et al. Quitosana e fitorreguladores na indução da organogênese direta em cultivar de algodão colorido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 839-843, 2014.
- SOUZA, A.; PEREIRA, A. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.
- SOUZA, A. C. et al. Cryopreservation and optimization of *in vitro* germination of *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1083, p. 481-483, 2015.
- SOUZA, A. C. et al. *In vitro* organogenesis in *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1, p. 177-184, 2017.
- XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p
- WEN, B. et al. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 323-335, 2012.
- WESLEY-SMITH, J. et al. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. **Annals of Botany**, v. 115, n. 6, p. 991-1000, 2015.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1 - Multiplicação *in vitro* de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (Bignoniaceae)**RESUMO**

Tabebuia roseoalba (Bignoniaceae), popularmente conhecida como Ipê-branco, é uma espécie arbórea que possui potencial medicinal e grande valor ornamental sendo muito utilizada na arborização urbana e para recomposição vegetal de áreas degradadas. Além disso, a espécie é nativa do Cerrado, e suas sementes apresentam baixa taxa de germinação em ambiente natural. Objetivou-se estabelecer um protocolo para multiplicação *in vitro* de *T. roseoalba* via organogênese direta. Para estabelecimento *in vitro*, efetuou-se um teste de germinação com sementes sem alas, desinfestadas e inoculadas em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de GA₃. Para indução das brotações, os explantes consistiram de segmentos nodais contendo um par de gemas axilares, sem as folhas. Posteriormente, testou-se a rizogênese das brotações com diferentes auxinas, seguida da aclimatização com substrato comercial ou vermiculita. Para germinação e estabelecimento *in vitro* de plântulas de *T. roseoalba* os melhores resultados foram para meio de cultura MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ apresentando germinação acima de 80%. Para indução de brotações *in vitro* o meio MS mostrou-se mais indicado, assim como a suplementação com uma combinação das citocininas BAP e KIN nas concentrações de 2,0 e 0,5 mg.L⁻¹, respectivamente, a 25 °C, para obtenção de aproximadamente 3,5 brotações por explante. Para rizogênese *in vitro* destas brotações recomenda-se o uso de meio de cultura MS, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB e geleificado com ágar. Por fim, para aclimatização, recomenda-se o enraizamento prévio das brotações e a utilização de substrato comercial para obtenção de 65% de sobrevivência das plântulas.

Palavras-chave: Conservação. Propagação Vegetativa. Ipê-branco. Cerrado.

1 INTRODUÇÃO

Em espécies florestais nativas do Cerrado é comum a ocorrência de sementes com baixa longevidade natural, o que dificulta sua utilização fora da sua época de produção (CARVALHO, SILVA, DAVIDE, 2006; SOUZA et al., 2015). Para *Tabebuia roseoalba* (Bignoniaceae), sabe-se que aproximadamente 80% das sementes são parasitadas por fungos do gênero *Fusarium*, um patógeno causador de danos tanto nas sementes em germinação, como em plântulas (DEGAN et al. 1997). Desta forma, as sementes de *T. roseoalba* perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas em condições naturais, mantendo-se viáveis por cerca de quatro meses (DEGAN et al., 2001; CABRAL, BARBOSA, SIMABUKURO, 2003; BORBA FILHO e PEREZ, 2009). Apesar disso, sementes do gênero *Tabebuia* são consideradas ortodoxas (GEMAQUE et al., 2005; SILVA et al., 2011).

Popularmente conhecida como Ipê-branco, *T. roseoalba* (Ridl.) Sandwith é uma árvore decídua, que apresenta floração branca exuberante, geralmente com a planta despida de sua folhagem, e suas raízes não destroem calçadas, sendo por isso muito utilizada na arborização urbana (LORENZI, 2008; LOHMANN, 2015). Trata-se de uma espécie florestal nativa do Cerrado, comumente explorada na medicina popular como anti-inflamatório e para redução do ácido úrico do sangue (FERRAZ-FILHA et al., 2016). Neste sentido, o Cerrado, onde predomina a ocorrência de *T. roseoalba*, é o segundo maior bioma brasileiro em extensão, considerado o mais ameaçado do país, e um dos 34 hotspots ambientais mundiais, atualmente considerado como área crítica para conservação, o que justifica esforços para conservação e propagação desta espécie (MYERS et al., 2000).

A cultura de tecidos vegetais compreende técnicas especialmente utilizadas para conservação e propagação vegetativa em larga escala, em particular para espécies de importância econômica, ornamental e medicinal, e pode ser aplicada para preservação de espécies florestais nativas do Cerrado (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; SOUZA et al., 2017). O desenvolvimento de pesquisas para otimização de técnicas de multiplicação em larga escala tem sido fundamental para propagação massiva de plantas medicinais nativas do Cerrado como *T. roseoalba* que são frequentemente exploradas de forma predatória e indiscriminada (OLIVEIRA e NETO, 2012), e pode gerar novas perspectivas para o melhoramento genético, e a obtenção de mudas sadias e/ou clones de indivíduos de interesse, estimulando sua produção comercial.

Por sua relevância, alguns trabalhos pontuais já foram realizados para conservação e propagação de *T. roseoalba*, utilizando técnicas de cultura de tecidos. Abbade et al. (2009) compararam a estrutura interna e externa de folhas de plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, e verificaram que as plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram menor densidade estomática e maior número de tricomas, que plantas cultivadas *in vitro*. Além disso, os mesmos autores avaliaram a germinação desta espécie em diferentes condições (*in vitro* e *ex vitro*) e recomendam utilizar o meio de cultura MS com 3,0 mg.L⁻¹ de GA₃ ou de 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃ em meio de cultura MS½, com 88% e 80% de germinação, respectivamente (ABBADE et al., 2010).

Mais adiante, Reis et al. (2013), trabalhando com cultivo *in vitro* de *T. roseoalba*, encontraram calos com potencial embriogênico provenientes de folhas cotiledonares cultivadas *in vitro*, em exposição ao regulador de crescimento α -naftalenoacético (ANA). Além disso, Porto et

al. (2014) compararam a estrutura anatômica entre folhas de plântulas germinadas *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos, e verificaram que as plântulas aclimatizadas com substrato comercial apresentaram-se maiores, com maior espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Diante do exposto, objetivou-se estabelecer um protocolo completo para multiplicação *in vitro* de *T. roseoalba*, via organogênese direta, a fim de contribuir com a sua conservação e propagação em larga escala.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e estabelecimento *in vitro*

Sementes de *T. roseoalba* (Ridl.) Sandwith foram fornecidas pelo Viveiro de Mudas Nordeste LTDA, Arcos – MG. As sementes foram coletadas na região sul de Minas Gerais, entre os meses de outubro e dezembro de 2015, e armazenadas em sacos de papel a ± 4 °C até serem enviadas para o laboratório. Após remoção manual das alas, a fim de minimizar as contaminações, as sementes foram lavadas com detergente e água corrente durante 20 minutos com subsequente desinfestação. O procedimento de desinfestação ocorreu em câmara de fluxo laminar por meio da imersão das sementes em álcool 70% durante 1 minuto, e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, durante 10 minutos conforme Souza et al. (2017).

Foi avaliado o percentual de germinação (G%) do lote de sementes e a necessidade de suplementação do meio de cultura com Ácido Giberélico (GA₃ - Sigma®). As sementes sem alas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com diferentes concentrações de GA₃ (0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹). Como controle foi utilizado o mesmo meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento, sendo 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento, em delineamento estatístico inteiramente casualizado. O meio de cultura foi geleificado com 0,7% de ágar (Sigma®), e teve seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, a 121 °C sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo as sementes foram transferidos para sala de crescimento, e mantidos sob luz fluorescente branca, com densidade de fluxo de fótons de 67 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de 25 ± 2 °C. A avaliação do G%

foi efetuada contabilizando-se o número de sementes com protusão radicular de ± 2 mm em cada tratamento, durante 10 dias.

Baseado nos experimentos anteriores, para estabelecimento *in vitro* das plantas matrizes de *T. roseoalba* foi utilizado o meio de cultura MS suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 e 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar (Sigma[®]), e teve seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo as sementes foram transferidos para sala de crescimento nas mesmas condições do teste de germinação.

2.2 Indução de brotações

Para indução de brotações, foram realizados três experimentos subsequentes, a fim de avaliar o melhor tipo citocinina, temperatura e meio de cultura. Os explantes para indução das brotações consistiram de segmentos nodais ($\pm 1,5$ cm), contendo um par de gemas laterais axilares, sem as folhas. Primeiramente, os explantes foram excisados de plântulas matrizes com 30 dias de cultivo *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS, suplementado com diferentes citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP - Sigma[®]), cinetina (KIN - Sigma[®]), thidiazuron (TDZ - Sigma[®]) e isopenteniladenina (2iP - Sigma[®]), nas concentrações (1,0; 2,0; 4,0 e $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Como controle foi utilizado o mesmo meio de cultura sem a adição dos reguladores de crescimento. Os meios de cultura foram acrescidos de 3% de sacarose, geleificados com 0,7% de ágar (Sigma[®]), e tiveram o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Posteriormente, os tubos contendo os explantes foram transferidos para duas temperaturas diferentes ($25 \text{ }^\circ\text{C}$ ou $35 \text{ }^\circ\text{C}$) em câmaras de germinação do tipo B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio), e fotoperíodo de 12 horas. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o número de brotos por explante, comprimento do maior broto e o percentual de sobrevivência dos explantes, em esquema fatorial triplo (citocininas x concentração x temperatura), sendo 15 repetições por tratamento, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

A fim de otimizar a indução de brotações, no segundo experimento foi testado o mesmo tipo de explante, os quais foram inoculados em meio de cultura MS, ou em MS com constituintes orgânicos modificado ($555 \text{ } \mu\text{M}$ de mio-inositol, $1,5 \text{ } \mu\text{M}$ de Tiamina HCl, $4,1 \text{ } \mu\text{M}$ de ácido

nicotínico e 2,4 μM de piridoxina HCl) (MS Modificado) (LEYVA et al., 2008), a uma temperatura de 25 °C. Os meios de cultura foram suplementados com diferentes concentrações (1,0; 2,0; 4,0 ou 8,0 mg.L^{-1}) das citocininas BAP ou TDZ (Sigma[®]). Como controles foram utilizados os mesmos meios de cultura sem a adição dos reguladores de crescimento. Os meios de cultura foram acrescidos de 3% de sacarose, geleificados com 0,7% de ágar (Sigma[®]), e tiveram o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento nas mesmas condições do teste de germinação. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se o número de brotos por explante, comprimento do maior broto e o percentual de sobrevivência dos explantes, em esquema fatorial triplo (meio de cultura x citocinina x concentração), sendo 15 explantes por tratamento, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Posteriormente, no terceiro experimento para indução de brotações, o mesmo tipo de explante foi excisado de plântulas matrizes com 30 dias de cultivo *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL dos meios de cultura MS ou WPM, nas mesmas condições do experimento anterior. Os meios de cultura foram suplementados com combinações das citocininas BAP (2,0; 4,0 ou 8,0 mg.L^{-1}) e KIN (0,5; 1,0 ou 2,0 mg.L^{-1}) (Sigma[®]). Como controles foram utilizados os mesmos meios de cultura sem a adição dos reguladores de crescimento. Os meios de cultura foram acrescidos de 3% de sacarose, geleificados com 0,7% de ágar (Sigma[®]), e tiveram o pH foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento nas mesmas condições do teste de germinação. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se o número de brotos por explante, em esquema fatorial duplo (meio de cultura x combinação de citocininas), sendo 15 explantes por tratamento, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

2.3 Indução de raízes

Brotações foram excisadas aos 30 dias de cultivo *in vitro*, e inoculados em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS, geleificado com 0,7% de ágar (Sigma[®]) ou 0,25% de phytigel (Sigma[®]), e suplementado com diferentes auxinas: ácido indol-3-acético (AIA - Sigma[®]), ácido indolil-3-butírico (AIB - Sigma[®]), α -naftalenoacético (ANA - Sigma[®]), ácido 2,4-

diclofenoxiacético (2,4-D - Sigma[®]) e ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico (Dicamba - Sigma[®]), em diferentes concentrações (1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹). Como controles foram utilizados os mesmos meios de cultura sem a adição dos reguladores de crescimento. Os meios de cultura foram acrescidos de 3% de sacarose e o pH foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Após inoculação, os tubos contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento nas mesmas condições do teste de germinação. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o percentual de enraizamento e o comprimento da raiz principal, em esquema fatorial triplo (agente geleificante x auxinas x concentração), sendo 15 explantes por tratamento, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Posteriormente, visando otimizar o protocolo de enraizamento de brotações, o mesmo tipo de explante foi inoculado em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS ou MS^{1/2} (metade da concentração de sais), acrescido de 3% de sacarose, 0,25% de phytigel (Sigma[®]), e suplementado com diferentes concentrações de carvão ativado (1,0 ou 2,0 mg.L⁻¹) e AIB (1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) (Sigma[®]). Como controles foram utilizados os mesmos meios de cultura sem a adição de carvão ativado e de reguladores de crescimento. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Após inoculação, os tubos contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento nas mesmas condições do teste de germinação. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o percentual de enraizamento e o comprimento da raiz principal, em esquema fatorial triplo (meio de cultura x carvão ativado x AIB), sendo 15 explantes por tratamento, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

2.4 Aclimatização

Para aclimatização foram selecionadas brotações sem passar pela etapa de enraizamento *in vitro*, e brotações enraizadas *in vitro* durante 30 dias. As brotações (com e sem raízes) foram transplantadas simultaneamente para tubetes (250 cm³), contendo substrato comercial (Tabela 1) ou vermiculita, e mantidos em casa de vegetação sob sombrite 30%. Os tubetes contendo as brotações foram envoltos com embalagem plástica transparente, para a manutenção da umidade relativa no ambiente, e tiveram suas pontas cortadas em intervalos de 7 dias, até sua completa remoção aos 21 dias. As plantas foram regadas com água destilada periodicamente e decorridos 30 dias do início da aclimatização, foi avaliado o percentual de sobrevivência, sendo 25 brotações

por tratamento, em esquema fatorial duplo (tipo de brotação x substrato), e delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Tabela 1 – Caracterização química do substrato comercial utilizado para aclimatização.

P (mg dm ⁻³)	298,30
C (g dm ⁻³)	64,68
Ca (cmol dm ⁻³)	15,27
Mg (cmol dm ⁻³)	6,28
K (cmol dm ⁻³)	0,22
Cu (mg dm ⁻³)	1,6
Zn (mg dm ⁻³)	5,2
Fe (mg dm ⁻³)	341,0
Mn (mg dm ⁻³)	42,0
Capacidade de retenção de água (%)	119,49
pH	5,1

A fim de verificar as características que permitiram a sobrevivência das plantas ao processo de aclimatização, foi avaliada a diferença de densidade estomática entre as plantas cultivadas *in vitro* e as plantas ao final do processo de aclimatização. As lâminas para avaliação da densidade estomática (número de estômatos/mm²) foram preparadas com a aplicação de cola de secagem rápida e incolor, na superfície foliar abaxial (SILVA et al., 2009). Após a secagem da cola, foi retirada a película como um “negativo” da epiderme foliar, com o auxílio de uma pinça. O “negativo” da epiderme foi então colocado sobre uma lâmina de vidro, com adição de uma gota de glicerina. Foram selecionadas 5 plantas de cada tratamento (condição *in vitro* e plantas aclimatizadas), destacando-se 5 folhas saudáveis e que não apresentassem sintomas visíveis de lesões, das quais foram feitas 40 imagens/campos. De cada imagem, foi contabilizado o número de estômatos evidentes, considerando cada imagem como uma repetição, em delineamento experimental inteiramente casualizado. A determinação da densidade estomática foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade (BIOGEN) da UNIFAL-MG. Para a visualização e captura das imagens, utilizou-se fotomicroscópio Axio Scope A1 e por meio do

software AxioVision SE64 Rel. 4.8, em que foram realizadas a avaliação da densidade estomática.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), por meio do *software* estatístico R Core Team (2011), versão 3.4.0, via pacote ExpDes.pt. As variáveis que não atenderam às pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade dos resíduos, sofreram transformação por meio da raiz quadrada.

3 RESULTADOS

A suplementação do meio de cultura MS com ácido giberélico (GA_3) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 $mg.L^{-1}$ proporcionou mais de 80% de germinação em todos os tratamentos, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do controle e mostrou-se adequada para otimização do percentual de germinação (G%) das sementes de *T. rosealba*. Contudo, as sementes expostas ao tratamento controle também germinaram e obtiveram cerca de 60% de germinação (Figura 3). Os estádios de germinação das sementes e o estabelecimento *in vitro* das plântulas de *T. rosealba* podem ser observados por meio da Figura 4.

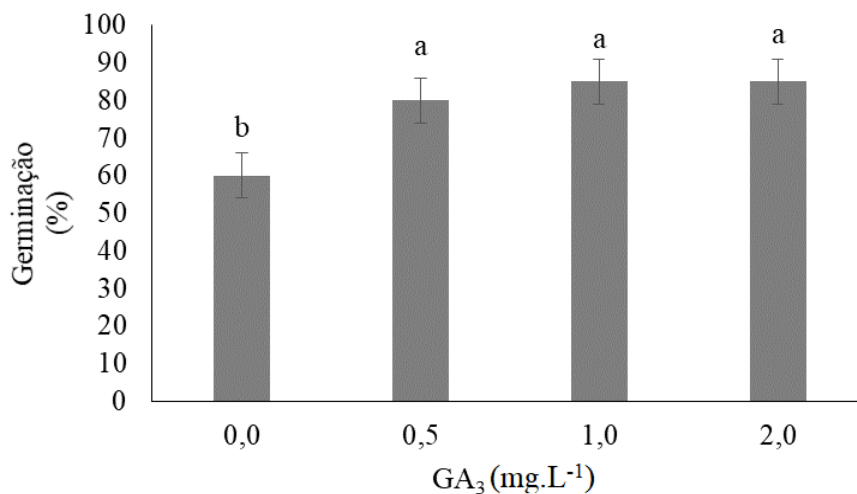


Figura 3 - Percentual de germinação (%) de sementes de *T. rosealba*, em diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3). Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.

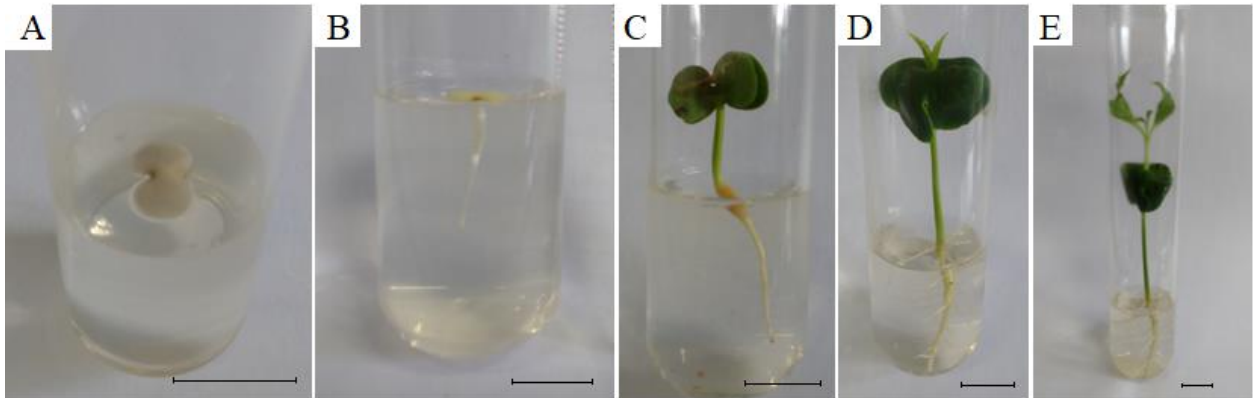


Figura 4 - Estabelecimento *in vitro* de *T. roseoalba*: 24 horas após desinfestação e inoculação (A), aos 3 dias de cultivo *in vitro* (B), aos 7 dias de cultivo *in vitro* (C), aos 15 dias de cultivo *in vitro* (D) e aos 30 dias de cultivo *in vitro* (E). Barras: 1,0 cm.

Na sequência do protocolo de micropropagação, apesar do baixo número de brotações por explante, o regulador de crescimento BAP foi significativamente ($p < 0,05$) melhor para indução de brotações do que as citocininas TDZ, KIN e 2iP, apresentando médias de 1,6; 1,1; 0,9 e 0,7 brotos, respectivamente (Figura 5A). Além disso, analisando-se separadamente cada concentração de BAP, os tratamentos com 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹ proporcionaram comprimento de brotações significativamente ($p < 0,05$) maiores (Figura 5B).

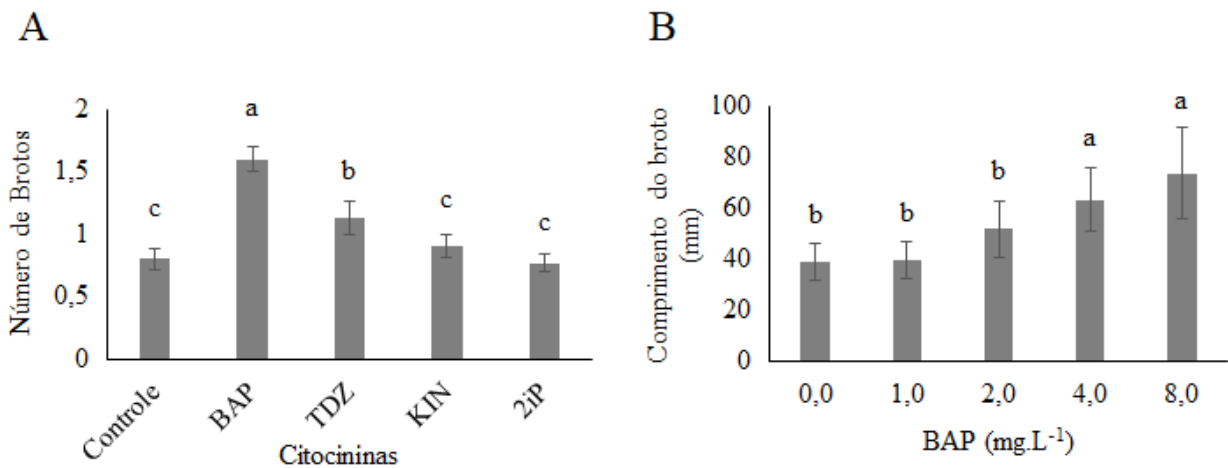


Figura 5 - Número médio de brotos independente da concentração (A) e comprimento do maior broto (B) em explantes de *T. roseoalba*, com 30 dias de cultivo *in vitro*. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para indução de brotações entre as duas temperaturas testadas (25 °C ou 35 °C). Contudo, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o comprimento do maior broto, de modo que com 25 °C, os reguladores BAP e TDZ apresentaram médias de 64,7 e 61,3 mm, respectivamente. Para a temperatura de 35 °C não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes citocininas testadas para o comprimento do broto. Contudo, esta temperatura foi significativamente ($p < 0,05$) melhor que 25 °C, para comprimento do maior broto, independentemente da citocinina (Tabela 2). Além disso, foi observada grande ocorrência de massas calogênicas na base dos explantes expostos aos tratamentos com citocininas, e raízes no tratamento controle.

Tabela 2 - Comprimento do maior broto (mm) de *T. roseoalba* com 30 dias de cultivo *in vitro*, em relação ao tipo de citocinina e às temperaturas avaliadas para indução de brotações, independente da concentração.

	Comprimento do maior broto (mm)			
	BAP	TDZ	KIN	2iP
25 °C	64,7 Ab	61,3 Ab	38,6 Bb	43,9 Bb
35 °C	82,1 Aa	69,1 Aa	70,4 Aa	73,5 Aa

* Letras maiúsculas comparam as médias na linha e letras minúsculas comparam em coluna. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Analisando-se separadamente cada concentração das diferentes citocininas, os explantes expostos à concentração de 1,0 mg.L⁻¹, apresentaram as maiores médias de comprimento do maior broto nos reguladores de crescimento 2iP e TDZ, com 59,1 e 48,7 mm, respectivamente. Por outro lado, o tratamento com 2,0 mg.L⁻¹ de 2iP reduziu significativamente ($p < 0,05$) o comprimento dos brotos em relação às demais citocininas, para 32,4 mm. Contudo, para os explantes expostos às concentrações de 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹, o regulador de crescimento BAP foi significativamente ($p < 0,05$) melhor que todas as demais citocininas, apresentando médias de 63,2 mm e 73,5 mm de comprimento de broto, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Comprimento do maior broto (mm) de *T. rosealba* em relação à concentração de cada tipo de citocinina testada para indução de brotações.

	Concentração de citocininas (mg.L ⁻¹)				
	0,0	1,0	2,0	4,0	8,0
BAP	38,8 Ab	39,6 Bb	51,6 Aa	63,2 Aa	73,5 Aa
TDZ	37,5 Ab	48,7 Aa	51,4 Aa	39,8 Bb	34,9 Bb
KIN	36,8 Ab	29,6 Bb	43,7 Aa	42,9 Bb	17,4 Bc
2iP	39,1 Ab	59,1 Aa	32,4 Bb	33,8 Bb	29,2 Bb

* Letras maiúsculas comparam as médias na linha e letras minúsculas comparam em coluna. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p<0,05$).

Com relação ao percentual de sobrevivência dos explantes ao final de 30 dias de cultivo *in vitro*, houve interação significativa ($p<0,05$) entre o tipo de citocinina e a temperatura testada. Desta forma, houve média de 91% e 80% de sobrevivência dos explantes, para as citocininas BAP e TDZ, respectivamente, que foram significativamente ($p<0,05$) melhores que as citocininas KIN e 2iP com 60% e 41%, respectivamente, na temperatura de 25 °C. Por outro lado, na temperatura de 35 °C, BAP e KIN apresentaram cerca de 80% de sobrevivência, o que foi significativamente ($p<0,05$) melhor que as citocininas 2iP e TDZ, com 70% e 61% de sobrevivência, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Percentual de sobrevivência (%) de explantes de *T. rosealba* em relação a cada tipo de citocinina e a temperatura testada para indução de brotações, independente da concentração.

	Percentual de sobrevivência de explantes (%)			
	BAP	TDZ	KIN	2iP
25 °C	91,6 Aa	80,0 Aa	51,6 Bb	60,0 Ab
35 °C	80,0 Aa	61,6 Bb	80,0 Aa	70,0 Ab

* Letras maiúsculas comparam as médias na linha e letras minúsculas comparam em coluna. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p<0,05$).

Na tentativa de otimização do protocolo de indução de brotações, não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as duas citocininas (BAP ou TDZ), que foram testadas separadamente. O tratamento controle apresentou média de 1,1 brotos, seguido de 1,6; 1,7; 1,9 e 1,5 brotos nos tratamentos com 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹, respectivamente e para ambos reguladores de crescimento (Figura 6A). Entretanto, avaliando-se diferentes formulações do meio

de cultura MS, o meio MS induziu quantidade significativamente ($p < 0,05$) maior de brotos em ambas citocininas testadas (Figura 6A). Por outro lado, o meio de cultura MS modificado promoveu maior comprimento de brotos independentemente da concentração e do tipo de citocinina, exceto para o tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ (Figura 6B). Em meio de cultura MS modificado, o maior comprimento de brotações foi obtido nas duas maiores concentrações de citocininas testadas (4,0 e 8,0 mg.L⁻¹) apresentando médias de 53 e 52 mm de comprimento, respectivamente.

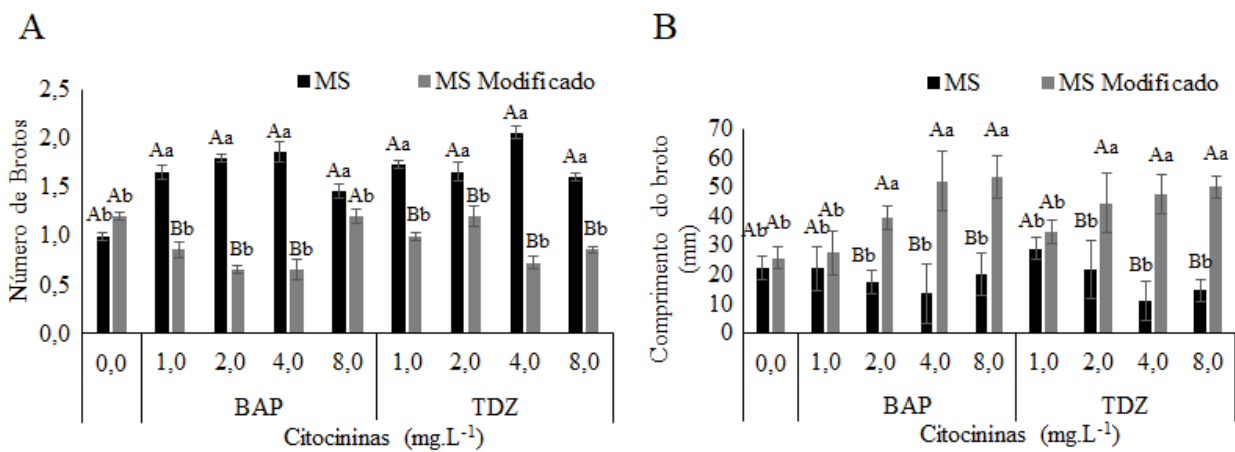


Figura 6 - Número médio de brotos por explante (A) e comprimento do maior broto (B) em *T. roseoalba*, em meio de cultura MS ou MS Modificado, e diferentes concentrações de citocininas. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam os meios de cultura. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.

Analisando-se o tipo e a concentração de cada citocinina isoladamente, o maior percentual de sobrevivência foi observado nos tratamentos controle, e com 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de TDZ que apresentaram 96,6%, 96,6% e 90% de sobrevivência, respectivamente (Tabela 5). A exposição dos explantes ao tratamento com 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹ de TDZ, e em todos os tratamentos com BAP, reduziram significativamente ($p < 0,05$) as taxas de sobrevivências, em relação ao controle. Além disso, analisando-se o tipo de meio de cultura, o meio MS modificado apresentou um percentual de sobrevivência dos explantes em torno de 88,6%, o que foi significativamente ($p < 0,05$) maior em relação ao meio MS, com 73,3%. Também foi observado grande ocorrência de massas calogênicas na base dos explantes expostos às diferentes concentrações de ambas citocininas.

Tabela 5 - Sobrevivência (%) de explantes de *T. roseoalba* em relação a cada tipo de citocinina e a sua concentração (mg.L^{-1}) testada para indução de brotações.

	Sobrevivência de explantes (%)				
	0,0	1,0	2,0	4,0	8,0
BAP	96,6 Aa	80,0 Bb	80,0 Bb	86,6 Bb	70,0 Cb
TDZ	96,6 Aa	96,6 Aa	90,0 Aa	63,3 Bc	60,0 Bc

* Letras maiúsculas comparam as médias na linha e letras minúsculas comparam em coluna. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

No terceiro experimento para indução de brotações, o meio de cultura MS mostrou-se significativamente ($p < 0,05$) melhor que o WPM, e a combinação das citocininas BAP e KIN foi significativa ($p < 0,05$) (Figura 7). Em meio de cultura MS, a ação conjunta das citocininas BAP e KIN nas combinações 2,0/0,5; 2,0/1,0; 4,0/0,5; 4,0/1,0; 4,0/2,0; 8,0/0,5; 8,0/1,0 e 8,0/2,0 mg.L^{-1} , apresentaram as maiores médias para o número de brotos com 3,0; 3,3; 2,93; 3,66; 3,33; 2,86; 3,20 e 2,93 brotos, respectivamente. Por outro lado, para o meio de cultura WPM, o único tratamento significativo ($p < 0,05$) para indução de brotações foi a combinação das citocininas BAP e KIN na proporção de 4,0/1,0 mg.L^{-1} , apresentando 3,15 brotações por explante. Além disso, todos os tratamentos combinados entre BAP e KIN apresentaram massas calogênicas na base dos explantes.

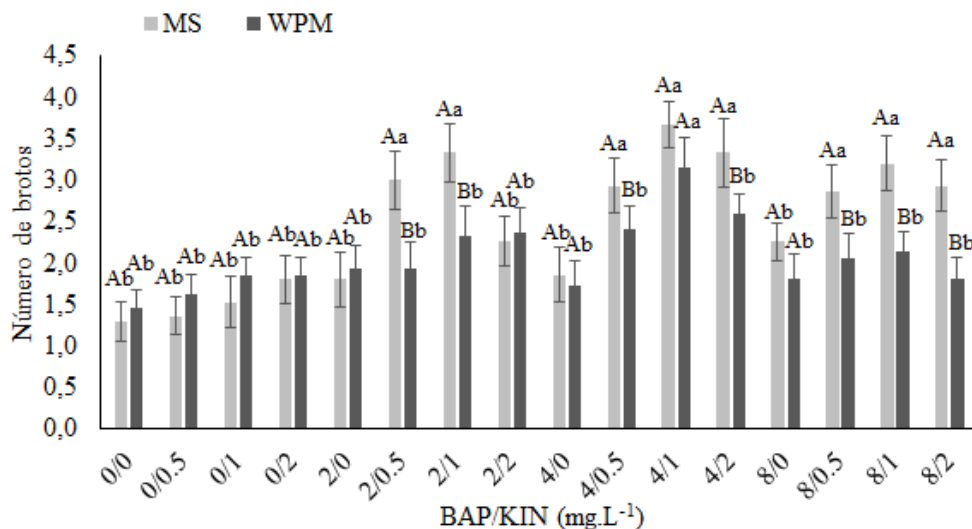


Figura 7 – Número de brotos por explante em *T. roseoalba*, submetidos a diferentes combinações entre as citocininas BAP e KIN, em meio de cultura MS ou WPM. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada combinação de citocininas e letras minúsculas comparam os meios de cultura. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.

Para rizogênese, as auxinas ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indolil-3-butírico (AIB) apresentaram resultados significativamente ($p < 0,05$) melhores que ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D), ácido α -naftalenoacético (ANA) e ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico (Dicamba) (Figura 8A). A auxina AIA, apresentou 94% e 90% de formação de raízes, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L^{-1} , respectivamente. Já para AIB, os melhores tratamentos para o percentual de formação de raízes foram com 2,0 e 4,0 mg.L^{-1} que apresentaram 91% e 93%, respectivamente. O tratamento controle apresentou cerca de 46% de enraizamento. Além disso, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o percentual de enraizamento e o comprimento das raízes quanto ao agente solidificante ágar ou phytigel. Para o comprimento de raiz, as auxinas AIA e AIB também apresentaram as maiores médias e não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si e do tratamento controle. Por outro lado, o tratamento com as auxinas 2,4-D, ANA e Dicamba reduziu significativamente ($p < 0,05$) o comprimento médio da raiz principal em todas as concentrações testadas (Figura 8B). Além disso, foram observadas massas calogênicas na base de todos os explantes expostos a auxinas.

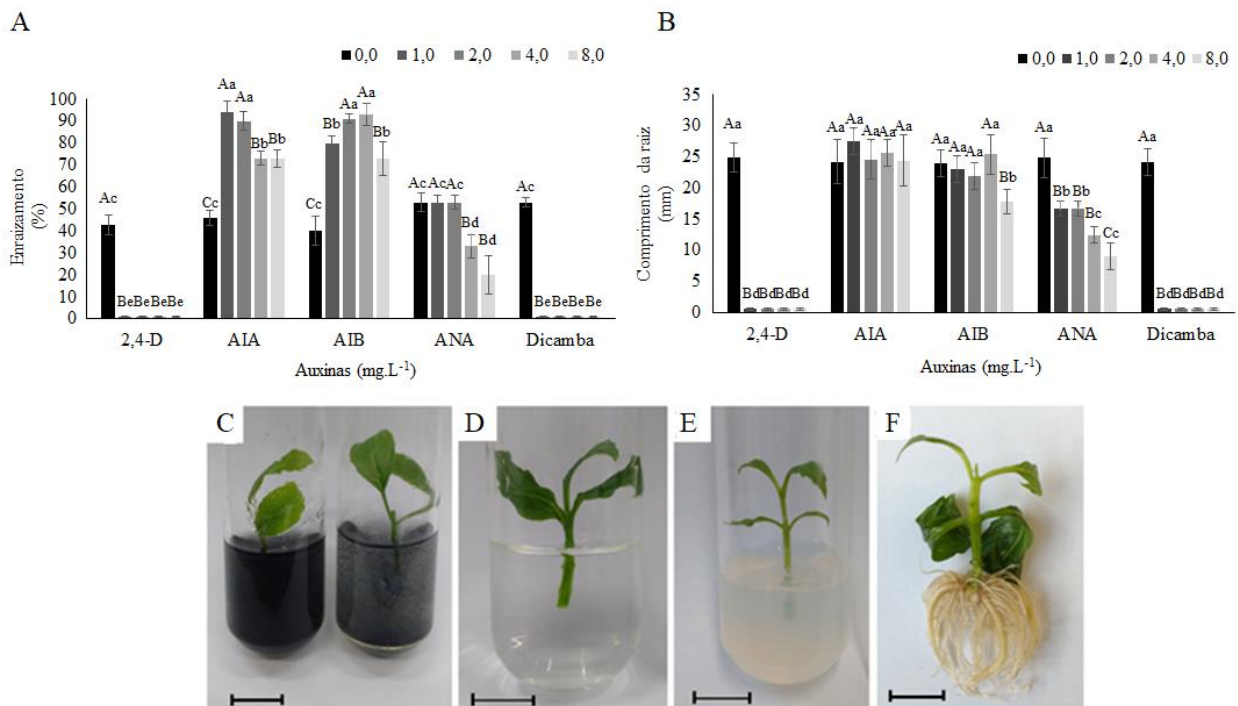


Figura 8 - Percentual de enraizamento (A) e comprimento de raiz principal (B) em brotações de *T. rosealba* submetida a diferentes concentrações de auxinas (mg.L^{-1}). Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada auxina e letras minúsculas comparam as diferentes concentrações. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Brotações de *T. rosealba*

com 30 dias de cultivo *in vitro* inoculadas em meio de cultura MS suplementado com carvão ativado (C), Phytigel (D), Ágar (E) e brotação após 30 dias de enraizamento *in vitro* (F). Barras: 1,0 cm.

Na tentativa de otimizar o protocolo de indução de raízes, não foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre meio de cultura MS e o meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, que apresentaram em média 51,5% e 54,5% de enraizamento, respectivamente. Também não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de carvão ativado, com 57,5%, 51,5% e 60,0%, para o tratamento controle e com 0,5 e 1,0 mg.L $^{-1}$ de carvão ativado, respectivamente. Por outro lado, quando avaliado isoladamente dos fatores meio de cultura e carvão ativado, o tratamento com 4,0 e 2,0 mg.L $^{-1}$ de AIB exibiu novamente as maiores médias de percentual de enraizamento de brotações, com 83,3% e 77,7% de enraizamento, respectivamente (Figura 9A). O tratamento com 1,0 mg.L $^{-1}$ de AIB e o tratamento controle, não tiveram um resultado satisfatório, com apenas 53,3% e 37,7% de enraizamento de brotações, respectivamente. Além disso, houve grande ocorrência de massas calogênicas em todos os tratamentos com AIB (Figura 9B).

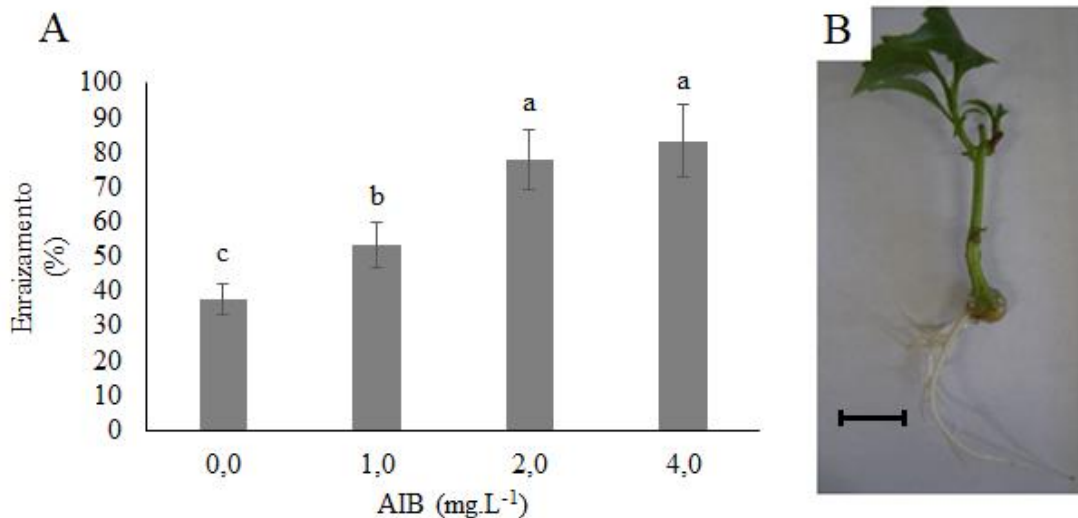


Figura 9 - Variação do percentual de enraizamento de brotações (A) de *T. rosealba*, submetida a diferentes concentrações de AIB (mg.L $^{-1}$), independentemente do meio de cultura e da concentração de carvão ativado. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Formação de massa calogênica na base dos explantes expostos tratamentos com AIB (B). Barra: 1 cm.

No processo de aclimatização (Figura 10), as brotações previamente enraizadas *in vitro* tiveram um percentual de sobrevivência significativamente ($p<0,05$) maior que as brotações sem raízes (enraizadas diretamente no substrato). Além disso, o tipo de substrato de cultivo também apresentou diferença significativa ($p<0,05$), de modo que brotações com raízes, em substrato comercial apresentaram 92% de sobrevivência, em relação ao substrato vermiculita com apenas 56% de sobrevivência (Tabela 6).

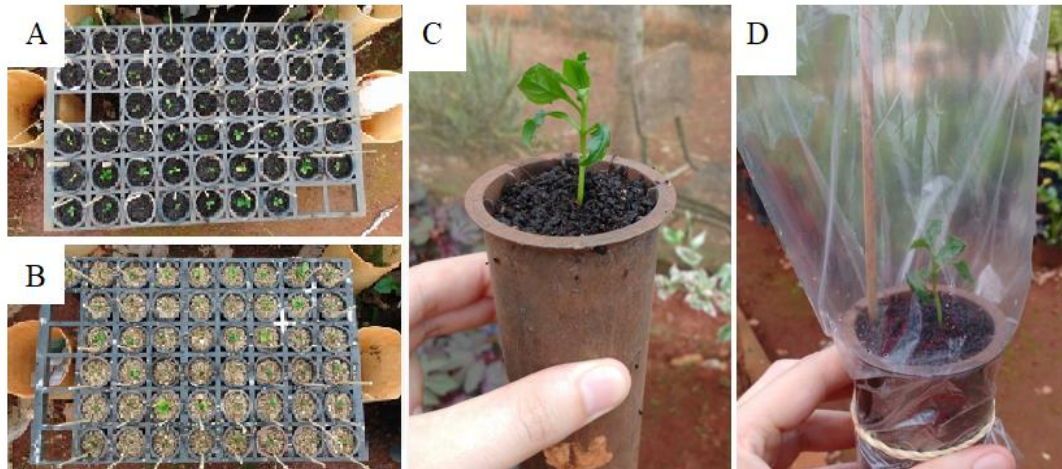


Figura 10 - Aclimatização de brotações de *T. roseoalba* com e sem raízes dispostas em substrato comercial (A) ou vermiculita (B), em tubetes de 250 cm³ (C) e envoltas por embalagem plástica transparente (D).

Tabela 6 - Percentual de sobrevivência (%) de plântulas de *T. roseoalba* com e sem enraizamento prévio (*in vitro*), transplantadas em dois substratos diferentes, durante o processo de aclimatização.

	Sobrevivência de plântulas (%)	
	Substrato comercial	Vermiculita
Com raiz		
Sim	92 Aa	56 Ab
Não	38 Ba	8 Bb

* Letras maiúsculas comparam as médias na coluna e letras minúsculas comparam na linha. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p<0,05$).

Quanto às análises morfoanatômicas de folhas, verificou-se redução significativa ($p<0,05$) na densidade estomática na face abaxial das folhas de brotações cultivadas *in vitro*, em relação as folhas das plantas ao final do processo de aclimatização, apresentando em média 196 e 176 estômatos por 1 mm², respectivamente (Figura 11).

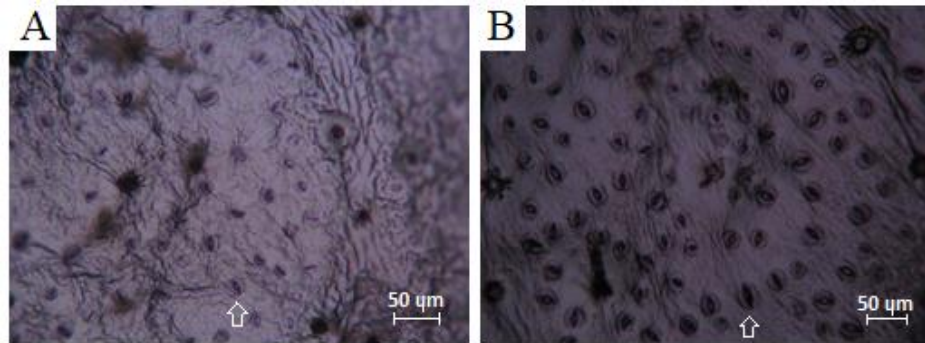


Figura 11 – Micrografia da secção paradérmica da face abaxial da folha de *T. roseoalba* cultivada *in vitro* (A) e ao final da aclimatização (B), capturada por meio de fotomicroscópio com lente objetiva com aumento de 10x. Seta = estômatos.

4 DISCUSSÃO

Para o estabelecimento *in vitro* de espécies florestais nativas do Cerrado, se faz necessário conhecer suas características de germinabilidade e vigor das sementes uma vez que estas são informações científicas relevantes para a cultura de tecidos vegetais (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Diante disso, foi atestada a viabilidade do lote de sementes de *T. roseoalba* adquiridas e utilizadas nos experimentos, por meio da análise de seu percentual de germinação (G%) que apresentou cerca de 60% no tratamento controle (Figura 3). Este resultado está de acordo com o G% de sementes desta espécie, quando colhidas no estágio maduro, e germinadas em condições de laboratório sob papel de filtro e fotoperíodo de 8 horas com aproximadamente 56,6% (DEGAN et al., 2001). Contudo, no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, o ácido giberélico (GA₃) é um regulador de crescimento comumente recomendando, uma vez que desempenha importante função associada com a germinação e controle da hidrólise das reservas, especialmente para espécies da família Bignoniaceae (SOUZA et al., 2017).

Para otimização do G% nesta espécie se faz necessário a suplementação do meio de cultura MS com GA₃. Desta forma, para germinação *in vitro* de sementes de *T. roseoalba*, Abbade et al. (2009) utilizaram meio de cultura MS, suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃). Em outro estudo, Abbade et al. (2010) recomendam a suplementação com 3,0

mg.L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura MS, para obtenção de 88% de germinação. Diante do exposto, e com base nos resultados deste estudo (Figura 3), é recomendável a suplementação do meio de cultura com pelo menos 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ para obtenção de 80% de germinação *in vitro* de sementes de *T. roseoalba*, por ser economicamente mais interessante. Esta taxa de germinação está de acordo com sementes de outras espécies de ipês, como por exemplo *H. impetiginosus*, as quais em ambiente controlado iniciam a germinação entre as primeiras 24 a 30 horas de cultivo, em presença de luz, alcançando cerca de 70% a 80% de germinação, devido a presença de giberelinas endógenas que regulam este processo nesta espécie (SILVA et al., 2004; SOARES et al., 2009).

Para o sucesso da multiplicação *in vitro*, na fase de brotação se faz necessário selecionar o melhor tipo de explante, e a citocinina utilizada, uma vez que este grupo de reguladores de crescimento, na concentração adequada, é indispensável para a quebra da dominância apical e proliferação de gemas axilares (XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; CAMERON, 2013; SOARES et al., 2014). Além disso, a proliferação de gemas axilares é a técnica mais utilizada para a micropropagação de plantas lenhosas devido a manipulação relativamente fácil, tamanho do explante utilizado, e por originar plantas geneticamente mais estáveis (CAMERON, 2013). Isto pode ser observado para estudos de organogênese direta em outras espécies de ipês como *H. chrysotrichus* (PEREIRA, NAVROSKI, REINIGER, 2015), *H. heptaphyllus* (DUARTE, SANSBERRO, LUNA, 2016) e *H. serratifolius* (SOUZA et al., 2017) com indução de brotações a partir de segmentos nodais contendo as gemas laterais, o que justifica a utilização das gemas laterais axilares neste trabalho.

No presente estudo, apesar do baixo número de brotações, o regulador de crescimento BAP foi melhor que as demais citocininas testadas para indução de brotações em explantes de *T. roseoalba* (Figura 5A), e permitiu maior comprimento dos brotos (Figura 5B). Para *Mimosa caesalpiniiifoli* (Fabaceae) a utilização de baixas concentrações (2,0 mg.L⁻¹) de BAP aumentou o número de brotações por explantes em relação ao controle, contudo, mesmo no tratamento controle, os níveis endógenos de citocininas foram suficientes para induzir o brotamento nos explantes (BEZERRA et al., 2014). Por outro lado, a presença de BAP no meio de cultura não foi benéfica à multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de plântulas de *H. chrysotrichus* (PEREIRA, NAVROSKI, REINIGER, 2015).

A indução de brotações *in vitro* se mostra bastante específica a cada genótipo, e pode estar associada a outros fatores além dos reguladores de crescimento, tais como luminosidade e temperatura (GEORGE, HALL e KLERK, 2008). Contudo, no presente estudo, não houve diferença entre as duas temperaturas testadas (25 °C e 35 °C) para indução de brotações em explantes de *T. roseoalba*, apenas para o comprimento médio do maior broto, e, além disso, a maior temperatura ocasionou maior senescência nas brotações (Tabela 3 e 4).

Uma vez que a composição do meio de cultura também pode influenciar as respostas morfogênicas *in vitro* (GEORGE, HALL e KLERK, 2008; DUARTE, SANSBERRO, LUNA, 2016), conduziu-se o segundo experimento com objetivo de comparar o efeito da interação entre as duas melhores citocininas determinadas no experimento anterior (BAP ou TDZ), em diferentes formulações do meio de cultura MS, para indução de brotações. Em meio de cultura MS houve maior quantidade de brotos (Figura 6A) em relação ao meio de cultura MS modificado, contudo, a quantidade de brotações induzidas também não foi satisfatória. Estes resultados podem estar relacionados à existência de um efeito diferencial dos vários tipos de citocininas, quando aplicados ao meio de cultura, e ao fato de cada tipo de meio interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno (CAMERON, 2013; SOARES et al., 2014).

Ainda que os ipês sejam espécies florestais nativas do Cerrado, e por isso lhes sejam mais recomendados a utilização de meios de cultura com menor concentração de sais como por exemplo o WPM em *H. chrysotrichus* (PEREIRA et al., 2015), a determinação do melhor meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *T. roseoalba* necessita ainda de maior experimentação. Isso porque novamente, o meio de cultura MS mostrou-se melhor para indução de brotações nesta espécie, porém, agora em comparação com o meio de cultura WPM (Figura 7). Por outro lado, em outro estudo, não foi observada diferença para o número de brotações em explantes de *Prunus persica* L. (Rosaceae), quando comparado o meio de cultura mais concentrado (MS) e o meio com menor concentração de sais (WPM) (RADMANN et al., 2009).

A utilização de combinações de diferentes reguladores de crescimento no meio de cultura tem demonstrado eficiência na multiplicação clonal *in vitro* (PINHAL et al., 2011). Para outra espécie de ipê como *H. heptaphyllus* foram obtidas brotações em mais de 50% dos explantes, a partir da combinação de 6-benziladenina (BA) e ácido indol-3-butírico (AIB) (DUARTE, SANSBERRO, LUNA, 2016). Desta forma, a combinação das citocininas BAP e KIN foi significativa, apresentando entre 2,86 e 3,66 brotos. Contudo, todos os tratamentos com BAP e

KIN apresentaram massas calogênicas na base do explantes, o que pode prejudicar o cultivo *in vitro* quando o objetivo é a organogênese direta, devido à falta de conexões vasculares. A formação de calos na base do explante pode comprometer a proliferação de gemas axilares e o alongamento de brotações, afetando o desenvolvimento *in vitro* (PEREIRA et al., 2015).

Uma vez que a formação de raízes adventícias é frequentemente apontada como fator limitante para propagação *in vitro* de espécies lenhosas, é necessário a adequação de meios de cultura específicos para esta etapa, e a utilização de auxinas geralmente se faz necessário para alcançar melhores resultados (CURTI e REINIGER, 2014). A rizogênese ou enraizamento *in vitro*, consiste no desenvolvimento de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da etapa de indução de brotações, e apesar de não ser essencial, pode possibilitar melhores resultados no transplântio para o ambiente *ex vitro* (SOUZA e PEREIRA, 2007; ROCHA et al., 2008). No presente estudo, o subcultivo das brotações diretamente para o meio de enraizamento proporcionou um resultado satisfatório para surgimento de raízes adventícias, inclusive no tratamento controle. Contudo, houve formação de massas calogênicas na base dos explantes, possivelmente por não ter sido realizada uma etapa complementar para limpeza, retirando o excesso de citocinina utilizada na etapa anterior. Estes resultados são relevantes visto que a utilização de BAP no meio de cultura prejudicou o estabelecimento *in vitro*, a formação de brotos, e também o enraizamento de *H. chrysotrichus*, além de aumentar consideravelmente a formação de calos (PEREIRA et al., 2015).

Além da determinação do balanço ideal de reguladores de crescimento, o tipo de agentes geleificantes, e a composição do meio de cultura também influenciam o crescimento de raízes e o desenvolvimento de culturas *in vitro* (CHAPLA et al., 2009; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). O ágar é o agente geleificante mais popular, constituindo-se basicamente de uma mistura de polissacarídeos, principalmente agarose e agarpectinas (GEORGE, HALL e KLERK, 2008), contudo, por vezes, é preciso assegurar sua pureza, o que pode interferir nas respostas morfogênicas. Além disso, têm sido encontrados resultados significativos quanto ao percentual de enraizamento *in vitro*, variando-se a o tipo e a quantidade dos agentes geleificantes, como nas culturas de abacaxizeiros e bananeiras (COSTA et al., 2007).

Para *Rosa chinensis*, foram obtidas taxas de enraizamento duas vezes maiores em meio de cultura geleificado com Phytigel, comparativamente ao ágar, sem, contudo, apresentarem diferenças na qualidade dos ramos regenerados (DINIZ et al., 2014). Já para *H. chrysotrichus*

melhores resultados para enraizamento foram obtidos sem adição de ágar no meio de cultura, inclusive as plantas cultivadas em meio sem ágar apresentaram maior número de folhas após a aclimatização (RABAIOLLI et al., 2017). No presente estudo não houve interação significativa para o percentual de enraizamento e o comprimento das raízes em brotações de *T. rosealba* quanto aos diferentes agentes geleificantes (ágar ou phytigel). Este resultado é relevante, uma vez que mudas cultivadas em meio de cultura contendo ágar muitas vezes exibem sistemas radiculares fracos e com ausência de pelos radiculares (SADEGHI et al., 2015), o que resulta em uma baixa taxa de sobrevivência das plantas na etapa de aclimatização (XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013).

Os melhores resultados para formação e comprimento de raízes nas brotações foram observados para as auxinas AIA e AIB, em comparação 2,4-D, ANA e Dicamba (Figura 8A e 8B). As auxinas são os reguladores de crescimento que mais influenciam o enraizamento, sendo AIA, ANA e AIB as mais utilizadas na etapa de rizogênese (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009; SOARES et al., 2014). A utilização destas auxinas no meio de cultura sinaliza as células responsivas, simulando o mecanismo hormonal natural das plantas (ROCHA et al., 2008). Desta forma, a ocorrência de enraizamento adventício *in vitro* pressupõe a existência de células responsivas aos sinais exógenos e aos níveis endógenos de auxinas oriundos da parte aérea (VIEIRA et al., 2007), bem como do tipo de meio de cultura e substâncias presentes no mesmo.

Dentre as auxinas, o AIB tem sido mais utilizado para a indução de raízes adventícias em explantes, devido a sua maior fotoestabilidade, além do custo reduzido (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009; SOARES et al., 2014). Contudo, pode haver alterações radiculares e outras complicações associadas ao processo de enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas como tecidos hiper-hídricos e sistemas radiculares subdesenvolvidos, que exigem o uso de tecnologias alternativas para eliminar muitas das dificuldades (XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Isso pode ser visto em outras espécies de ipês como *H. impetiginosus*, onde verificou-se melhores resultados de enraizamento a partir da inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense* no meio de cultura, reduzindo assim a utilização de auxinas nesta etapa (LARRABURU e LLORENTE, 2015). Neste estudo, para AIB, os melhores tratamentos para o percentual de formação de raízes foram com 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ que apresentaram 91% e 93%, respectivamente.

A concentração elevada de sais do meio de cultura MS também pode prejudicar o enraizamento de brotos em algumas espécies, o que tem levado alguns pesquisadores a trabalhar

com formulações mais diluídas deste meio (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009; DUARTE, SANSBERRO, LUNA, 2016). Diante da possibilidade de redução dos custos, é possível alterar a concentração de sais do meio de cultura MS, visando melhores respostas na organogênese e multiplicação de plantas *in vitro* (GEORGE, HALL e KLERK, 2008; DUARTE, SANSBERRO, LUNA, 2016). Isto foi verificado no estabelecimento de um protocolo de micropropagação para *H. heptaphyllus* utilizando meio de cultura líquido para superar problemas de necrose nas brotações (DUARTE, SANSBERRO E LUNA, 2016). Em outro estudo, Villa et al. (2005) verificaram que concentrações reduzidas de sais no meio de cultura MS possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de *Rubus fruticosus* (amoreira-preta), cultivar Cainguangue. Além disso, o uso de carvão ativado no meio de cultura pode trazer benefícios para o enraizamento *in vitro* de espécies florestais nativas do Cerrado (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009). Entretanto, neste estudo, não houve diferença significativa para as diferentes concentrações de carvão ativado, e entre meio de cultura MS e o meio de cultura MS^{1/2}.

A aclimatização constitui uma etapa crítica na cultura de tecidos vegetais, uma vez que o cultivo *in vitro* modifica as características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando os processos fisiológicos normais (HARTMANN et al., 2011; PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Nesta etapa, ocorre a transferência das plantas para condições externas ao laboratório (*ex vitro*), o que pode ser limitante para algumas espécies, uma vez que ocorre a transição do metabolismo essencialmente heterotrófico para o autotrófico, havendo um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas que não sobrevive nesse período (BATAGIN, 2009; PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Isto pode ocorrer devido a vários fatores, como por exemplo o sistema radicular adventício produzido *in vitro* ser, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pelos radiculares, com raízes pouco funcionais na absorção de água e nutrientes durante a aclimatização (HOFFMANN et al., 2001; HARTMANN et al., 2011). Desta forma, o enraizamento *ex vitro* diretamente no substrato apresenta vantagens como aumento da sobrevivência e do desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*, reduzindo o tempo e os custos de produção (AUGUSTO et al., 2006). Entretanto, no presente estudo, as brotações de *T. roseoalba* previamente enraizadas *in vitro* tiveram um percentual de sobrevivência maior que as brotações sem raízes (sem passar pela etapa de enraizamento *in vitro*), apresentando em média 92% e 38% de sobrevivência, respectivamente, em substrato comercial (Tabela 6).

A taxa de mortalidade das plantas transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro* é frequentemente elevada devido ao dessecamento (HARTMANN et al., 2011). Além do estresse nas plântulas provocado pela perda excessiva de água, a sobrevivência é afetada pela mudança do metabolismo essencialmente heterotrófico para o autotrófico (BATAGIN, 2009; PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Desta forma, a escolha do tipo de substrato mais adequado pode influenciar diretamente no sucesso da aclimatização, reduzindo a taxa de mortalidade de plantas (SCHUCH, 2005). Dentre os substratos mais utilizados pode-se citar vermiculita, areia, turfa, casca de arroz carbonizada e pó de carvão, cujas proporções variam conforme a espécie (PINHAL et al., 2011; RABAIOLLI et al., 2017). De acordo com Hartmann et al. (2011), um bom substrato deve ser firme e denso o suficiente para dar sustentação ao sistema radicular; não encolher ou expandir com a variação da umidade; reter água em quantidade adequada; e ser suficientemente poroso para permitir a drenagem da água e a aeração. Desta forma, o tipo de substrato de cultivo (substrato comercial ou vermiculita) avaliado neste estudo também apresentou diferença significativa para a sobrevivência das plântulas (Tabela 6).

Trabalhando com a mesma espécie, Porto (2014) comparou a estrutura anatômica entre folhas de plântulas germinadas *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos, e verificou que as plântulas aclimatizadas com substrato comercial apresentaram-se maiores, com maior espessura dos parênquimas paliádico e esponjoso. Isso pode ter ocorrido devido a diferença de densidade, uma vez que substratos com alta densidade prejudicam o crescimento de raízes (SKREBSKY et al., 2006). Comparando os substratos vermiculita, casca de arroz carbonizada e substrato comercial, na aclimatização de plântulas de *Morus nigra*, Villa et al. (2006) também verificaram maior crescimento de raízes e sobrevivência nas plantas cultivadas no substrato comercial. Desta forma, as características físicas (densidade baixa e maior capacidade de retenção de água) do substrato comercial podem ter contribuído para uma maior sobrevivência das plântulas de *T. roseoalba* durante o processo de aclimatização.

A densidade estomática é considerada um fator de alta plasticidade em decorrência da exposição das plantas a diferentes ambientes (DOUSSEAU et al., 2008; HARTMANN et al., 2011). Neste estudo, houve redução significativa na densidade estomática das folhas de brotações durante a passagem do cultivo *in vitro* o ambiente *ex vitro* (Figura 11), o que pode ter contribuído para o sucesso da aclimatização (Figura 10). Os estômatos ocorrem na face abaxial da lâmina foliar, na maioria das espécies da família Bignoniaceae, exceto em *T. aurea*, que é

anfiestomática, apresentando estômatos em ambas as faces (SILVA et al., 2009). Entretanto, poucos estudos foram efetuados a fim de caracterizar a densidade estomática e os efeitos do cultivo *in vitro*, bem como as possíveis alterações estomáticas durante a aclimatização de plantas, em espécies desta família. Abbade et al. (2009) também verificaram uma menor densidade estomática e maior número de tricomas em folhas de plantas adultas de *T. roseoalba* cultivadas *ex vitro* quando comparadas com plantas cultivadas *in vitro*. Por outro lado, Dousseau et al. (2008) não observaram diferença estatística para densidade estomática quando compararam folhas de plantas de *H. serratifolius* propagadas *in vivo*, *in vitro* e durante a aclimatização.

5 CONCLUSÕES

Para otimização da germinação, e estabelecimento *in vitro* de plântulas de *T. roseoalba* recomenda-se a utilização de meio de cultura MS suplementado com pelo menos 0,5 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃).

Para indução de brotações *in vitro* em segmentos nodais de *T. roseoalba* é recomendado o meio de cultura MS, suplementado com a combinação das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN) nas concentrações de 2,0 e 0,5 mg.L⁻¹, respectivamente, à temperatura de 25 °C.

Para rizogênese *in vitro* de brotações de *T. roseoalba* recomenda-se o uso de meio de cultura MS^{1/2}, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de ácido indolil-3-butírico (AIB) e geleificado com ágar, sem a necessidade de carvão ativado, ou de etapas adicionais para alongamento das brotações.

Para aclimatização, recomenda-se o enraizamento prévio das brotações de *T. roseoalba* e a utilização de substrato comercial.

6 REFERÊNCIAS

ABBADE, L. C. et al. Anatomia foliar de Ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand.) Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.

ABBADE, L. C. et al. Germinação de sementes de ipê-branco em diferentes substratos e meios de cultura. **Magistra**, v. 22, p. 162-167, n. 3-4, 2010.

- AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 473-476, 2006.
- BATAGIN, K. D. et al. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiros cv. IAC Gomo-de-mel micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botânica Brasília**, v. 23, n. 1, p. 85-92, 2009.
- BEZERRA, R. M. F. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth.(Fabaceae). **Revista Árvore**, v. 38, n. 5, 2014.
- BORBA FILHO, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. D. Armazenamento de sementes de Ipê-branco e Ipê-roxo em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 259-269, 2009.
- CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasílica**, v. 17, n. 4, p. 609-617, 2003.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.
- CHAPLA, P. I. et al. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.
- 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**, v. 3, n. 1, p. 41-47, 1997.
- DEGAN, P. et al. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de ipê-branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 492-496, 2001.
- DOUSSEAU, S. et al. Leaf anatomy of *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich.(Bignoniaceae) propagated *in vitro*, *in vivo* and during the acclimatization. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.
- FERRAZ-FILHA, Z. S. et al. *Tabebuia roseoalba*: *In vivo* hypouricemic and anti-inflammatory effects of its ethanolic extract and constituents. **Planta Medica**, v. 82, n. 16, p. 1395-1402, 2016.
- GEMAQUE, R. C. R. et al. Efeito das secagens lenta e rápida em sementes de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, v. 11, n. 4, p. 329-335, 2005.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. **Springer**, 2008.

- HOFFMANN, A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira “marubakaido”. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 2, p. 462-467, 2001.
- JUNIOR, F.; POETA, P. C.; PEREIRA, J. E. S. *In vitro* germination and propagation of cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) AC Smith-Fabaceae). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.
- LEYVA, J. F. G. et al. Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. **International Journal of Botany**, v. 4, n. 3, p. 326-330, 2008.
- LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.
- LOHMANN, L. G. Bignoniaceae in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 2, 2015.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4a edição. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, v. 1, p. 384, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- OLIVEIRA, E. R.; NETO, L. M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte-MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.
- PEREIRA, M. D. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex a. dc.) Mattos. **Nativa**, v. 3, n. 1, p. 59-63, 2015.
- PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
- PORTO, J. M. P. et al. Anatomical analyses of *Tabebuia roseoalba* (Bignoniaceae) seedlings during acclimatization process. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 8, n. 7, p. 257-264, 2014.
- RADMANN, E. B. et al. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp.'GXN-9'. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 2, p. 95-101, 2009.

REIS, M. V. et al. Cytochemical and ultrastructural analysis of pro-embryogenic masses in *Tabebuia roseoalba*. **Acta Horticulturae**, v. 988, p. 186-213, 2013.

SCHUCH, A. C. E. M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

SILVA, A. M. L. et al. Anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de ipês. **Hoehnea**, v. 36, n. 2, p. 329-338, 2009.

SILVA, E. A. A. et al. Germination studies on *Tabebuia impetiginosa* Mart. Seeds. **Cerne**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2004.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, 2006.

SOARES, F. P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1847-1852, 2009.

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

SOARES, T. D. C. et al. Quitosana e fitorreguladores na indução da organogênese direta em cultivar de algodão colorido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 839-843, 2014.

SOUZA, A. C. et al. Cryopreservation and optimization of *in vitro* germination of *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1083, p. 481-483, 2015.

SOUZA, A. C. et al. *In vitro* organogenesis in *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1, p. 177-184, 2017.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-116, 2007.

SOUZA, R. R. et al. Optimizing of the *in vitro* jenipapo seeds germination process. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 6, p. 155-163, 2016.

TEAM, R. D. C. **R Development Core Team: R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011.

VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 (*Malus pumilla*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 128-132, 2007.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.

VILLA, F. et al. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 1, 2006.

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

ARTIGO 2 - Multiplicação *in vitro* de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Martius (Bignoniaceae)

RESUMO

Cybistax antisiphilitica (Bignoniaceae), é uma espécie arbórea nativa do Cerrado que apresenta grande potencial medicinal, paisagístico e indicações para recomposição vegetal de áreas degradadas. Contudo, em espécies florestais nativas é comum a ocorrência de sementes com baixa longevidade natural, o que dificulta sua utilização fora da época de produção. Objetivou-se estabelecer um protocolo de multiplicação *in vitro* para *C. antisiphilitica*, via organogênese direta. Para estabelecimento *in vitro*, efetuou-se um teste de germinação com sementes sem alas, inoculadas em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de GA₃. Para indução das brotações, foram testados os explantes segmentos nodais contendo um par de gemas axilares, hipocótilo e raízes. Posteriormente, estas brotações foram enraizadas e aclimatizadas. Para germinação de sementes e estabelecimento *in vitro* de plantas matrizes recomenda-se a utilização de meio de cultura MS ou MS^{1/2}, sem necessidade de suplementação com GA₃. Para indução de brotações *in vitro* recomenda-se a utilização de segmento nodal como explantes, contendo um par de gemas axilares e sem as folhas, que devem ser excisados de plantas matrizes com 30 dias de cultivo, e inoculados em meio de cultura MS suplementado com 8,0 mg.L⁻¹ de BAP. Para enraizamento *in vitro* de brotações recomenda-se a inoculação em meio de cultura MS, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB, sem a necessidade de etapas adicionais para alongamento das brotações. Posteriormente, para aclimatização o transplântio das brotações enraizadas deve ocorrer em substrato comercial.

Palavras-chave: Conservação. Micropropagação. Plantas Medicinais. Ipê-verde. Cerrado.

1 INTRODUÇÃO

Pertencente à família Bignoniaceae, e popularmente conhecido como Ipê-verde, *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Martius é o único representante do gênero *Cybistax*, na flora brasileira (SILVA e QUEIROZ, 2003). Trata-se de uma árvore nativa de biomas brasileiros como Cerrado e Pantanal, que apresenta indicações para paisagismo e arborização urbana devido a seu porte mediano e pela coloração distinta de suas flores, além de ser bastante recomendada para recomposição vegetal de áreas degradadas (LORENZI, 2008; LOHMANN, 2015). Esta espécie também apresenta grande potencial medicinal, uma vez que metabólitos secundários, como os triterpenos, já foram caracterizados e estão associados à atividade antimicrobiana das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (RAMOS et al., 2003). Além disso, o lapachol,

extraído da casca, teve atividade larvicida comprovada por inibir o desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2005), e atividade anticancerígena (GARKAVTSEV et al., 2011).

Diante do exposto, a exploração predatória de plantas que produzem compostos bioativos, aliada à crescente demanda por mudas de espécies florestais nativas do Cerrado para reflorestamento, evidencia a necessidade do desenvolvimento de protocolos de conservação *ex situ* e multiplicação *in vitro* que otimizem sua produção, com alta qualidade morfofisiológica e capazes de atender às necessidades dos plantios (LELES et al., 2006; VIANI e RODRIGUES, 2007; FUMAGALI et al., 2008). Além disso, em espécies florestais nativas é comum a ocorrência de sementes com baixa longevidade natural, o que dificulta sua utilização fora da época de produção (CARVALHO, SILVA, DAVIDE, 2006; SOUZA et al., 2015; SOUZA et al., 2017), e justifica esforços para conservação e propagação de *C. antisiphilitica*.

A cultura de tecidos vegetais compreende técnicas especialmente utilizadas para conservação e propagação vegetativa em larga escala que podem ser aplicadas para *C. antisiphilitica* (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Além disto, o cultivo *in vitro* pode indicar caminhos para potencializar a produção de metabólitos secundários desta espécie, e servir de base para estudos futuros de melhoramento vegetal e seleção de genótipos superiores (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Desta forma, uma vez que não são conhecidos trabalhos de conservação *in vitro* para esta espécie, objetivou-se estabelecer um protocolo completo de multiplicação *in vitro* para *C. antisiphilitica*, via organogênese direta, a fim de contribuir com sua conservação e propagação em larga escala.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e estabelecimento *in vitro*

Sementes de *C. antisiphilitica* (Martius) Martius foram fornecidas pelo Viveiro de Mudas Nordeste LTDA, Arcos – MG. As sementes foram coletadas na região sul de Minas Gerais, entre os meses de outubro e dezembro de 2015, e armazenadas em sacos de papel a ± 4 °C até serem enviadas para o laboratório. Após remoção manual das alas, a fim de minimizar as contaminações, as sementes foram lavadas com detergente e água corrente durante 20 minutos com subsequente desinfestação. O procedimento de desinfestação ocorreu em câmara de fluxo

laminar por meio da imersão das sementes em álcool 70% durante 1 minuto, e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, durante 10 minutos conforme Souza et al. (2017).

Antes do estabelecimento *in vitro* das plantas matrizes, foi avaliado o percentual de germinação (G%) do lote de sementes, e a necessidade de suplementação do meio de cultura com Ácido Giberélico (GA₃ – Sigma[®]), em diferentes meios de cultura. As sementes sem alas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS^{1/2} (metade da concentração de sais), WPM - Wood Plant Medium (MCCOWN e LLOYD, 1981) e WPM^{1/2} (metade da concentração de sais). Os meios de cultura foram suplementados com diferentes concentrações de GA₃ (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) (Sigma[®]) em esquema fatorial duplo (meios de cultura x concentrações de GA₃) e delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento. Como controles foram utilizados os mesmos meios de cultura sem a adição de reguladores de crescimento. Os tubos de ensaio contendo as sementes foram transferidas para sala de crescimento, e mantidos sob luz fluorescente branca, com densidade de fluxo de fótons de 67 μM m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de 25 ± 2 °C. A avaliação do G% foi efetuada contabilizando-se o número de sementes com protusão radicular de ± 2 mm durante 30 dias de cultivo *in vitro*. Posteriormente, o meio de cultura utilizado para estabelecimento *in vitro* foi o MS suplementado com 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar (Sigma[®]), e teve seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

2.2 Indução de brotações

Para indução das brotações *in vitro*, primeiramente foi avaliado o potencial de brotação de diferentes tipos de explantes, os quais foram excisados de plântulas matrizes com 90 dias de cultivo *in vitro*. Os explantes avaliados foram segmentos nodais (±1,5 cm) contendo um par de gemas axilares e sem as folhas, segmentos de raízes principal (±1,5 cm) e segmentos de hipocótilo (±1,5 cm). Em seguida, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP - Sigma[®]) (1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹). Como controle foi utilizado o mesmo meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento. O meio de cultura foi suplementado com 3%

de sacarose, 0,7% de ágar (Sigma[®]) e teve o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Posteriormente, os tubos contendo os explantes foram transferidos para as mesmas condições do teste de germinação e estabelecimento *in vitro*. Aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o número de brotos por explantes e o comprimento do maior broto, em esquema fatorial duplo (tipo de explante x concentração de BAP), sendo 15 explantes por tratamento, em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

No segundo experimento para indução das brotações *in vitro*, segmentos nodais ($\pm 1,5$ cm) foram excisados de plantas com 30 dias de cultivo *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS. O meio de cultura foi suplementado com diferentes citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP - Sigma[®]), cinetina (KIN - Sigma[®]), thidiazuron (TDZ - Sigma[®]) e isopenteniladenina (2iP - Sigma[®]), nas concentrações (1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹). Como controle foi utilizado o mesmo meio de cultura sem a adição dos reguladores de crescimento. O meio de cultura foi acrescido de 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar (Sigma[®]), e teve o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Após inoculação, os tubos contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento nas mesmas condições do teste de germinação e estabelecimento *in vitro*. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o número de brotos por explante, o comprimento do maior broto e a sobrevivência dos explantes, em esquema fatorial duplo (citocininas x concentração), sendo 20 explantes por tratamento, e delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Subsequentemente, no terceiro experimento para indução de brotações foi avaliado o potencial de brotação *in vitro* para segmentos nodais ($\pm 1,5$ cm) excisados de plantas com 30 dias de cultivo *in vitro*, inoculados em meio de cultura MS suplementado com BAP (Sigma[®]), nas concentrações (1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹). Como controle foi utilizado o mesmo meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento. O meio de cultura foi suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar (Sigma[®]) e teve o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Posteriormente, os tubos contendo os explantes foram transferidos para câmaras de germinação do tipo B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio) ajustadas para duas temperaturas diferentes (25 °C ou 35 °C), e com fotoperíodo de 12 horas. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se o número de brotos por explante e o comprimento do

maior broto, em esquema fatorial duplo (concentrações de BAP x temperatura), sendo 30 explantes por tratamento, e delineamento estatístico inteiramente casualizado.

2.3 Indução de raízes

Para indução de raízes *in vitro*, as brotações foram excisadas aos 30 dias de cultivo a partir do experimento de indução de brotações, e inoculados diretamente em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS. O meio de cultura foi suplementado com diferentes auxinas: ácido indol-3-acético (AIA - Sigma[®]), ácido indolil-3-butírico (AIB - Sigma[®]), α -naftalenoacético (ANA - Sigma[®]), ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D - Sigma[®]) e ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico (Dicamba - Sigma[®]), em diferentes concentrações (1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹). Como controle foi utilizado o mesmo meio de cultura sem a adição dos reguladores de crescimento. Os meios de cultura foram acrescidos de 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar (Sigma[®]), e tiveram o pH ajustado para 5,7 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Após inoculação, os tubos contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento nas mesmas condições do teste de germinação e estabelecimento *in vitro*. Aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o percentual de enraizamento das brotações e o comprimento da raiz principal, em esquema fatorial duplo (auxinas x concentração), sendo 15 brotações por tratamento, e delineamento estatístico inteiramente casualizado.

2.4 Aclimatização

Para aclimatização foram selecionadas brotações enraizadas *in vitro* durante 30 dias e brotações que não passaram pela etapa de enraizamento *in vitro*. As brotações (com e sem raízes) foram transplantadas simultaneamente para tubetes (250 cm³), contendo substrato comercial (Tabela 7) ou vermiculita, os quais foram mantidos em casa de vegetação sob sombrite 30%. Os tubetes contendo as brotações foram envoltos com embalagem plástica transparente, para manutenção da umidade relativa no ambiente, e tiveram suas pontas cortadas em intervalos de 7 dias, até sua completa remoção aos 21 dias. As brotações foram regadas com água destilada

periodicamente, conforme a necessidade. Decorridos 30 dias do início da aclimatização, foi avaliado o percentual de sobrevivência das plantas, em esquema fatorial duplo (tipo de brotação x substrato), sendo 25 brotações por tratamento, e delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Tabela 7 – Caracterização química do substrato comercial utilizado para aclimatização.

P (mg dm ⁻³)	298,30
C (g dm ⁻³)	64,68
Ca (cmol dm ⁻³)	15,27
Mg (cmol dm ⁻³)	6,28
K (cmol dm ⁻³)	0,22
Cu (mg dm ⁻³)	1,6
Zn (mg dm ⁻³)	5,2
Fe (mg dm ⁻³)	341,0
Mn (mg dm ⁻³)	42,0
Capacidade de retenção de água (%)	119,49
pH	5,1

Visando verificar as características que permitiram a sobrevivência das plantas ao processo de aclimatização, foi avaliada a diferença de densidade estomática entre as plantas cultivadas *in vitro* e as plantas ao final do processo de aclimatização. As lâminas para avaliação da densidade estomática (número de estômatos/mm²) foram preparadas com a aplicação de cola de secagem rápida e incolor, na superfície foliar abaxial (SILVA et al., 2009). Após a secagem da cola, foi retirada a película como um “negativo” da epiderme foliar, com o auxílio de uma pinça. O “negativo” da epiderme foi então colocado sobre uma lâmina de vidro, com adição de uma gota de glicerina. Foram selecionadas 5 plantas de cada tratamento (condição *in vitro* e plantas aclimatizadas), destacando-se 5 folhas saudáveis e que não apresentassem sintomas visíveis de lesões, das quais foram feitas 40 imagens/campos. De cada imagem, foi contabilizado o número de estômatos evidentes, considerando cada imagem como uma repetição, em delineamento experimental inteiramente casualizado. A determinação da densidade estomática foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade (BIOGEN) da UNIFAL-MG. Para a

visualização e captura das imagens, utilizou-se fotomicroscópio Axio Scope A1 e por meio do software AxioVision SE64 Rel. 4.8, em que foram realizadas a avaliação da densidade estomática.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), por meio do *software* estatístico R Core Team (2011), versão 3.4.0, via pacote ExpDes.pt. As variáveis que não atenderam às pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade dos resíduos, sofreram transformação por meio da raiz quadrada.

3 RESULTADOS

Os meios de cultura MS e MS $\frac{1}{2}$ apresentaram as melhores taxas de germinação *in vitro* de sementes, independentemente da concentração de GA $_3$, com 92% e 84% de germinação, respectivamente. Por outro lado, os meios de cultura WPM e WPM $\frac{1}{2}$ não diferiram entre si, e obtiveram percentual de germinação significativamente ($p < 0,05$) menor, com 72% e 78% de germinação, respectivamente (Figura 12A). Além disso, não houve influência significativa ($p < 0,05$) de GA $_3$ para germinação *in vitro* de sementes dentre as diferentes concentrações testadas, sendo desnecessário sua utilização no meio de cultura, e permitindo um bom desenvolvimento *in vitro* das plântulas (Figura 12B, 12C e 12D).

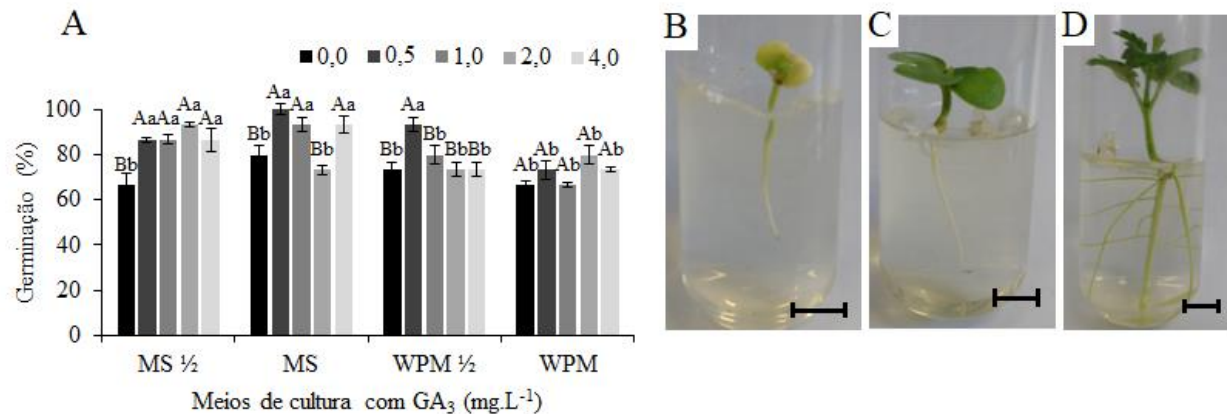


Figura 12 - Percentual de germinação (%) de sementes de *C. antisiphilitica* (A), em diferentes meios de cultura e concentrações do regulador de crescimento ácido giberélico (GA₃). Letras maiúsculas comparam as médias nas diferentes concentrações de GA₃ e letras minúsculas comparam dentro de cada meio de cultura. Letras iguais dentro de cada tipo de meio de cultura não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão das médias. Protrusão radicular de semente (B), plântula germinada aos 7 dias (C) e aos 25 dias (D) de cultivo *in vitro*. Barras = 1,0 cm.

Para indução de brotações *in vitro*, o explante segmento nodal foi significativamente ($p < 0,05$) melhor que os demais tipos de explantes (Figura 13A). Além disso, em segmentos nodais, os tratamentos controle e com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP foram significativamente ($p < 0,05$) melhores em relação ao comprimento do broto, apresentando 20,64 e 22,59 mm de comprimento, respectivamente (Figura 13B). Por outro lado, os tratamentos com 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹ de BAP reduziram significativamente ($p < 0,05$) o comprimento do broto, apresentando 16,38; 9,91 e 8,90 mm, respectivamente. Com relação ao tempo de cultivo *in vitro*, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre 30 e 60 dias de cultivo, para indução de brotações nos diferentes tipos de explantes (Figura 13C). Contudo, o explante segmento nodal apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para o comprimento médio dos brotos aos 30 e 60 dias de cultivo, atingindo 13,9 e 17,4 mm de comprimento, respectivamente (Figura 13D).

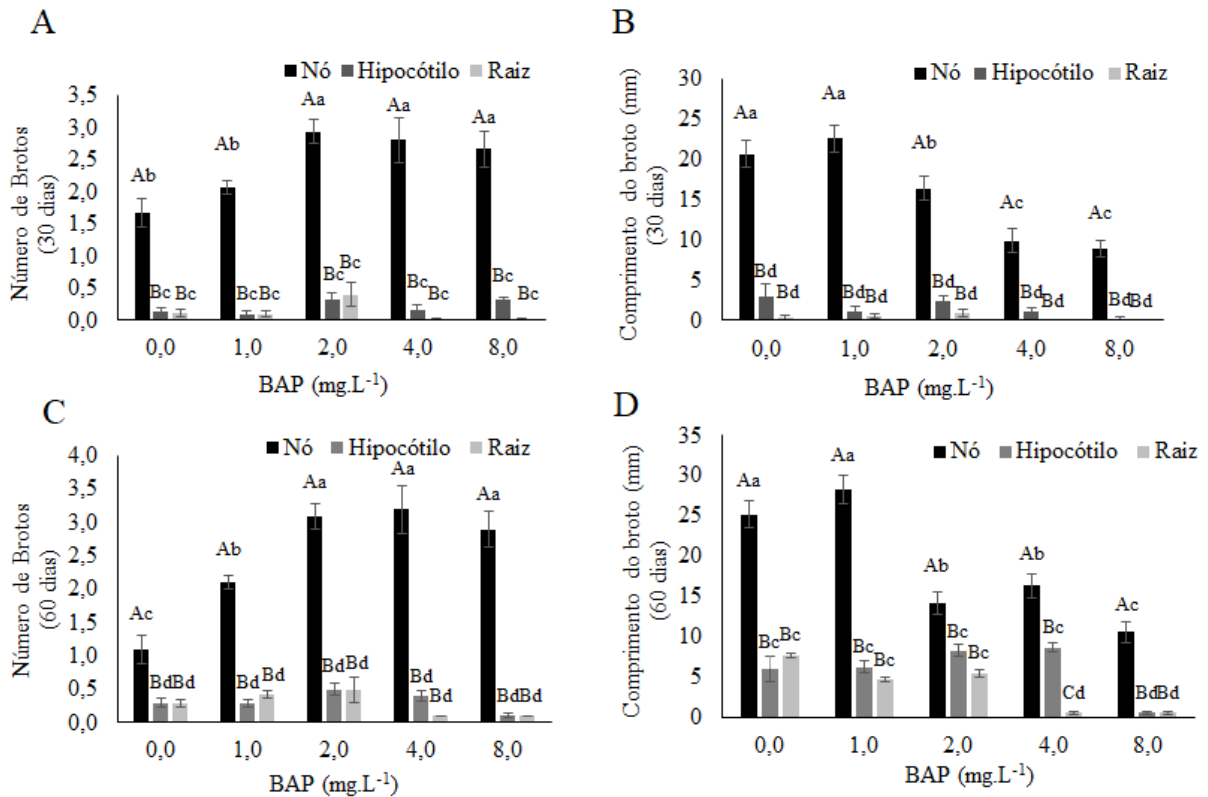


Figura 13 - Número médio de brotos (A) e comprimento do maior broto (B) com 30 dias de cultivo *in vitro*, e número médio de brotos (C) e comprimento do maior broto (D) com 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes explantes de *C. antisiphilitica* expostos ao BAP. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam os diferentes explantes. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Após determinação do melhor tipo de explante, foram utilizados segmentos nodais para avaliar o efeito de diferentes citocininas na indução de brotações *in vitro*. Os tratamentos com as maiores concentrações de BAP (4,0 e 8,0 mg.L⁻¹) foram significativamente ($p < 0,05$) melhores que as demais citocininas, apresentando 2,4 e 2,75 brotos por explante, respectivamente (Figura 14A). Contudo, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o comprimento do broto independente da citocinina e da concentração testada (Figura 14B). Para o percentual de sobrevivência do explante em relação às diferentes concentrações de citocininas, o tratamento controle apresentou cerca de 50,0%, e diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos com 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹ que apresentaram 85,0%, 87,5%, 81,25% e 77,5%, respectivamente (Figura 14C).

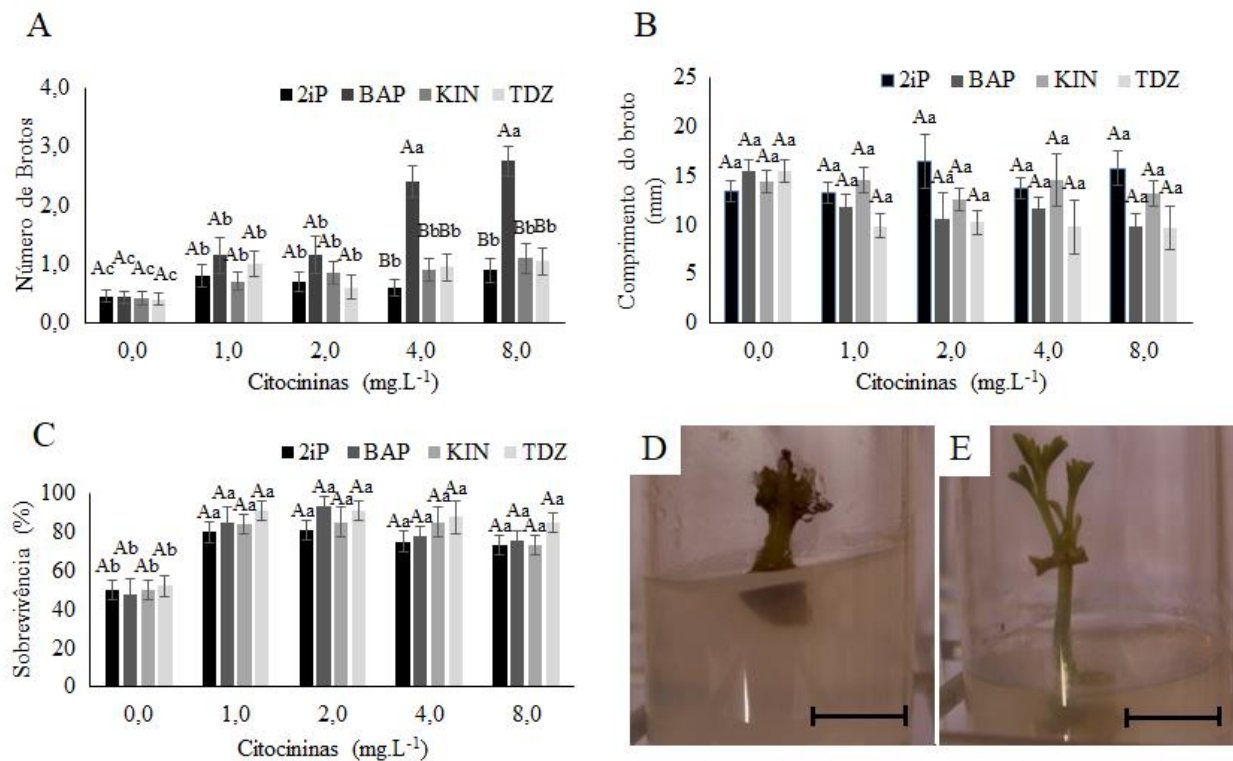


Figura 14 - Número médio de brotos por explante (A), comprimento do maior broto (B) e percentual de sobrevivência dos explantes (C) de *C. antisiphilitica* expostos diferentes citocininas. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam os diferentes reguladores de crescimento. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Explante senescente (D) e explante sadio (E) de *C. antisiphilitica* expostos diferentes citocininas. Barras: 1,0 cm.

Na tentativa de otimização do protocolo para indução de brotações *in vitro*, utilizou-se segmentos nodais de plantas matrizes mais jovens, aos 30 dias de cultivo *in vitro* (Figura 15C). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas temperaturas testadas (25 °C e 35 °C) para indução de brotações *in vitro*. Entretanto, o tratamento com 8,0 mg.L⁻¹ de BAP foi significativamente ($p < 0,05$) melhor que os demais tratamentos, apresentando média de 6 brotações por explante (Figura 15A). Por outro lado, as maiores concentrações de BAP (4,0 e 8,0 mg.L⁻¹) reduziram significativamente ($p < 0,05$) o comprimento das brotações para 12,66 e 10,38 mm, respectivamente, em relação ao controle (Figura 15B).

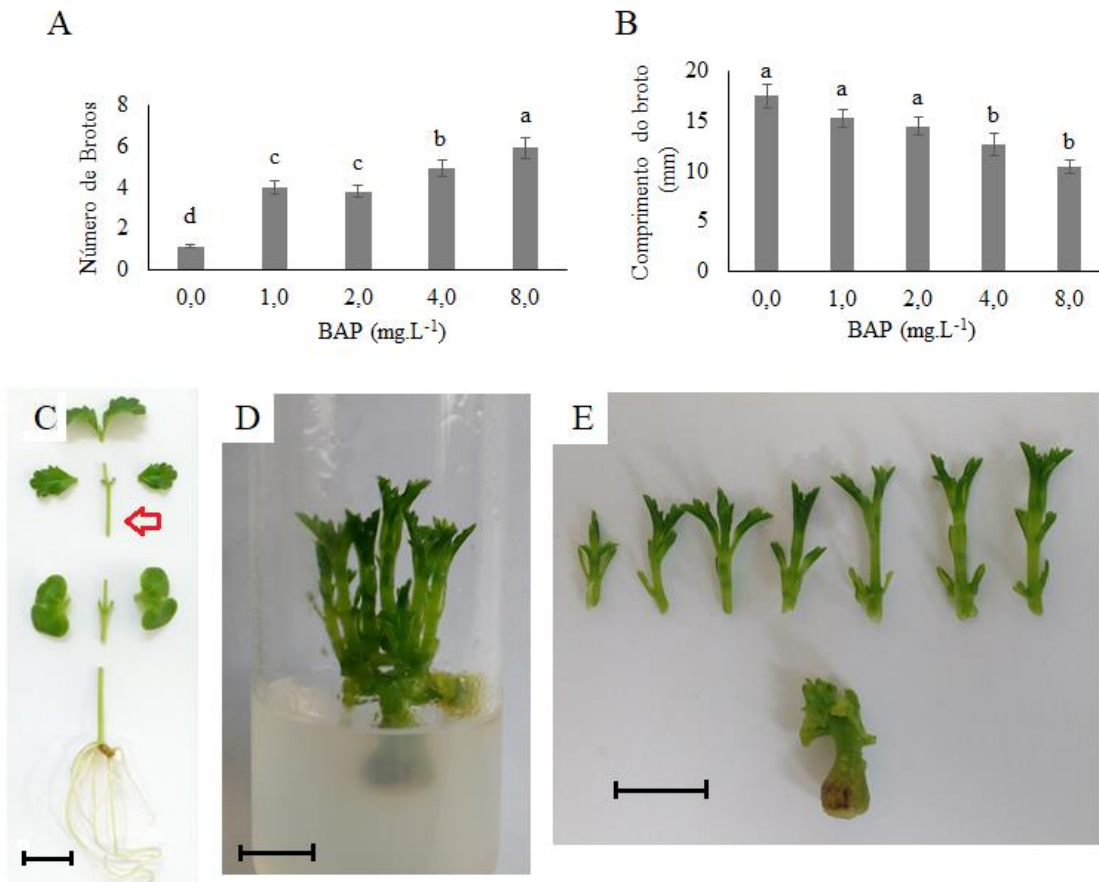


Figura 15 - Número médio de brotos por explante (A), e comprimento do maior broto (B) de *C. antisiphilitica* exposta a diferentes concentrações de BAP. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Segmentação de uma plântula de *C. antisiphilitica* com 30 dias de cultivo *in vitro* (C), segmento caulinar do primeiro par de folhas completamente expandido, contendo as duas gemas laterais utilizado nos experimentos de brotação (seta vermelha). Explante apresentando múltiplas brotações (D), brotações excisadas do explante original (E). Barras: 1,0 cm.

Com relação ao percentual de enraizamento *in vitro* de brotações, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a 30 e 60 dias de cultivo. O tratamento com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB foi significativamente ($p < 0,05$) melhor que os demais tratamentos para o percentual de enraizamento de brotações com 76%, e também para o comprimento de raízes, apresentando cerca de 24,96 mm de comprimento (Figura 16B). Os tratamentos com 2,4-D e Picloran reduziram significativamente ($p < 0,05$) o percentual de enraizamento e o comprimento das raízes em relação ao tratamento controle. Além disso, foi observada grande ocorrência de massas calogênicas na base das brotações (Figura 16D).

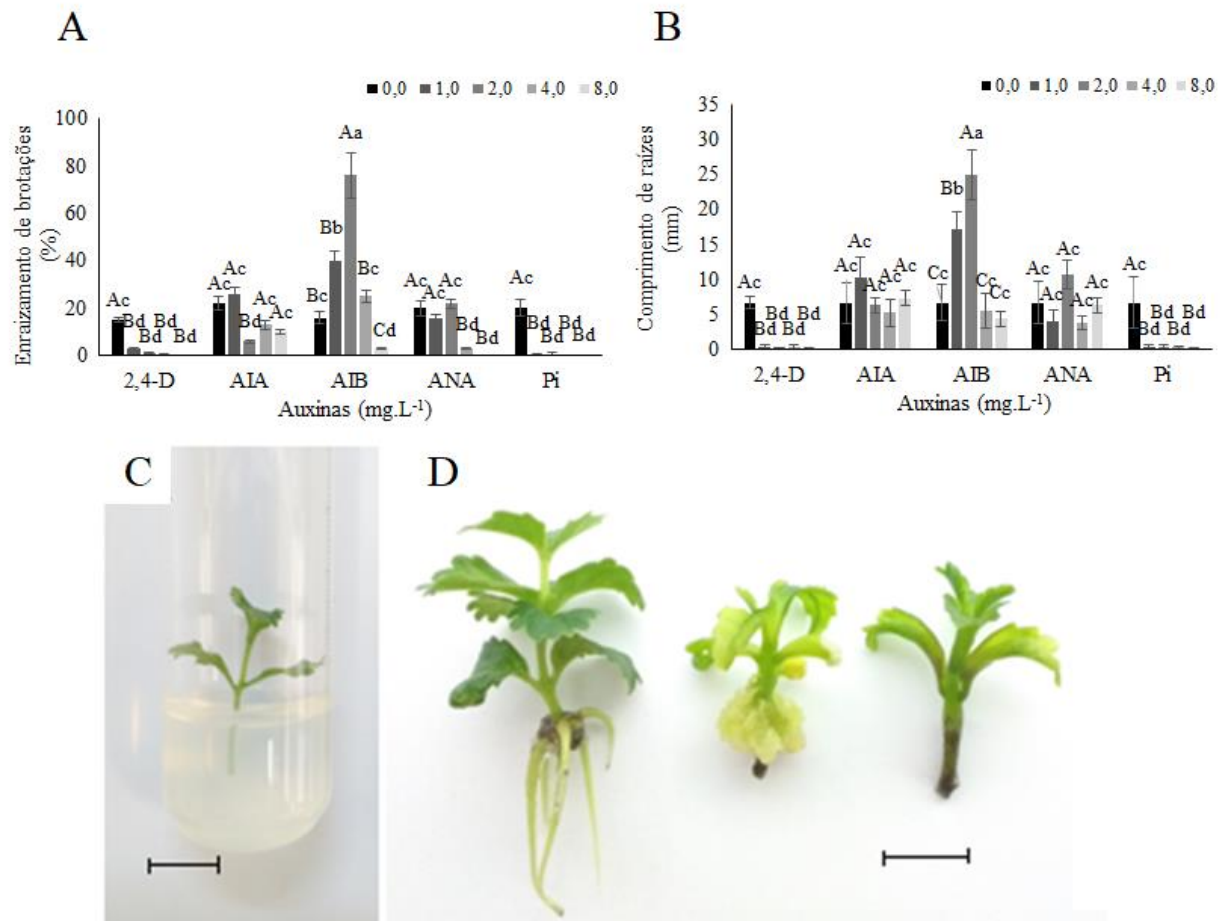


Figura 16 - Percentual de enraizamento de brotações (A) e comprimento da raiz principal (B) de *C. antisiphilitica* expostas a diferentes concentrações de auxinas. Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam os diferentes reguladores de crescimento. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Brotação de *C. antisiphilitica* com 30 dias de cultivo *in vitro* disposta em meio de cultura MS com diferentes auxinas (C), explante enraizado (esquerda), com massa calogênica meio) e sem enraizamento (direita) (D). Barras: 1,0 cm.

No processo de aclimatização (Figura 17), as brotações previamente enraizadas *in vitro* e transplantadas para o substrato comercial alcançaram em média 60% de sobrevivência, o que foi significativamente ($p < 0,05$) maior que as transplantadas em vermiculita que apresentaram 31% de sobrevivência (Tabela 8). Além disso, a ausência de raízes nas brotações (transplantadas diretamente no substrato), reduziu significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência ao processo de aclimatização, chegando a 9% no substrato vermiculita (Tabela 8).

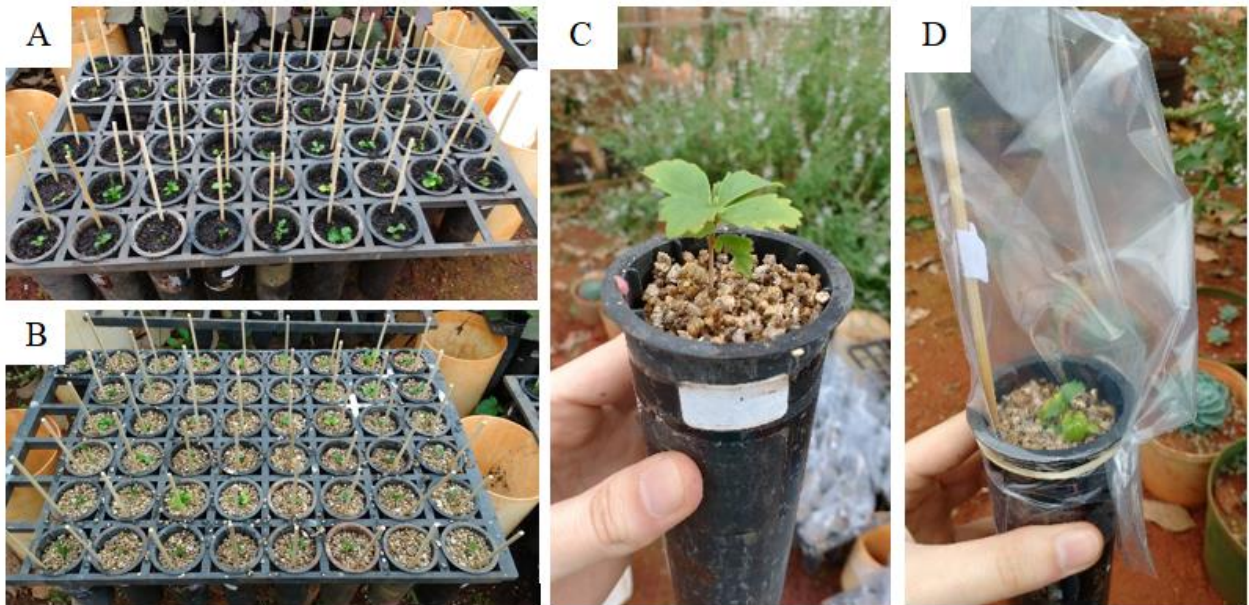


Figura 17 - Aclimatização de brotações de *C. antisiphilitica* com e sem raízes dispostas em substrato comercial (A) ou vermiculita (B), em tubetes de 250 cm³ (C) e envoltas por embalagem plástica transparente, com palito de sustentação (D).

Tabela 8 - Percentual de sobrevivência (%) de plântulas de *C. antisiphilitica* com e sem enraizamento prévio (*in vitro*), transplantadas em dois tipos de substratos diferentes.

Com raiz	Sobrevivência de plântulas (%)	
	Substrato comercial	Vermiculita
Sim	60 Aa	31 Ab
Não	19 Ba	9 Bb

* Letras maiúsculas comparam as médias na coluna e letras minúsculas comparam na linha. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Quanto às análises morfoanatômicas de brotações foi possível verificar uma redução significativa ($p < 0,05$) na densidade estomática da face abaxial das folhas de brotações cultivadas *in vitro*, em relação as folhas das plantas ao final do processo de aclimatização, apresentando em média, 196 e 170 estômatos por 1 mm², respectivamente (Figura 18).

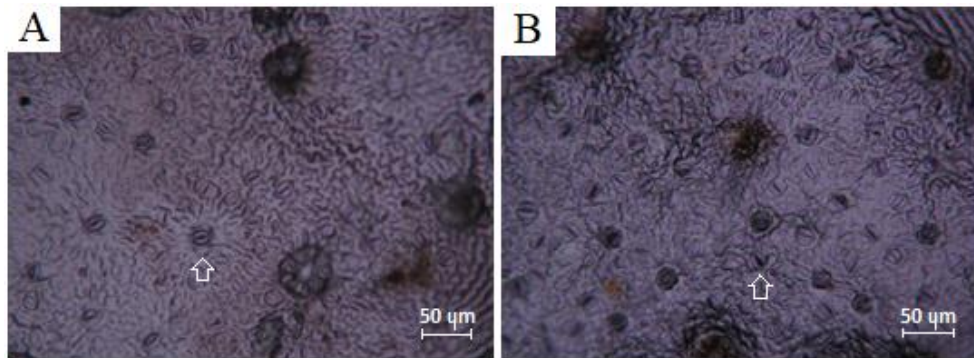


Figura 18 – Micrografias de secções paradérmicas da face abaxial de folhas de *C. antisiphilitica* cultivadas *in vitro* (A) e ao final da aclimatização (B) capturada por meio de fotomicroscópio com lente objetiva com aumento de 10x. Setas = estômatos.

4 DISCUSSÃO

O mercado de plantas medicinais está em constante ascensão, devido ao aumento no uso de produtos naturais, o que torna relevante as pesquisas de otimização de sua conservação e propagação (CLEMENTE et al., 2008). Diante do exposto, a germinação de sementes *in vitro* é a melhor opção para se conseguir plantas matrizes em condições assépticas, e a partir delas iniciar-se a cultura de explantes, como folhas, segmentos nodais, entre outras (MERCIER e NIEVOLA, 2003; PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). *C. antisiphilitica* é uma espécie arbórea nativa que produz grande quantidade de sementes aladas (OLIVEIRA et al., 2006), que não apresentam dormência e dispersam-se com aproximadamente 10% de teor de água, e podem levar até 26 dias para germinarem em condições naturais (SALOMÃO et al., 2003). Contudo, as informações a respeito do potencial germinativo *in vitro* de sementes de *C. antisiphilitica* são incipientes.

De acordo com Santos et al. (1998), a espécie apresenta entre 53% e 56,6% de germinação em condições de laboratório, e cerca de 38,2% e 40,8% de emergência no campo. Além disso, em um estudo de conservação de sementes por acondicionamento a vácuo, não houve variação no percentual de germinação (entre 83% e 90%), em relação ao tempo de armazenamento (FREITAS et al., 2012). Desta forma, os resultados do presente estudo podem ser considerados excelentes para o lote de sementes desta espécie, uma vez que foi observado um percentual de germinação de 92% e 84% em meio de cultura MS e MS½, respectivamente (Figura 12A).

No estabelecimento *in vitro* de plantas, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam a germinação, crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, HALL e KLERK, 2008; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Em geral, para o cultivo de espécies lenhosas, o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) não tem se mostrado satisfatório, apesar de ser o meio de cultura mais amplamente utilizado, de forma que composições mais diluídas em macronutrientes podem apresentar melhor desempenho das culturas (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Desta forma, é justificável o esforço para comparar o meio de cultura WPM (MCCOWN e LLOYD, 1981), que apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônio presentes no meio de cultura MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, que tem sido amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (RABAIOLLI et al., 2017).

A suplementação do meio de cultura com giberelinas tem sido empregada na regulação da germinação em várias espécies de plantas medicinais e árvores nativas do Cerrado, especialmente para espécies da família Bignoniaceae (ABBADE et al., 2009; SOUZA et al., 2017). Para germinação *in vitro* de sementes de *T. roseoalba*, Abbade et al. (2009) utilizaram meio de cultura MS, suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃). Contudo, enquanto para diversas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência, para outras elas apresentam pequena resposta ou nenhum efeito (SOARES et al., 2009). Neste trabalho, a suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de GA₃ não se mostrou significativa na promoção da germinação *in vitro* de sementes de *C. antisiphilitica*, indicando que o conteúdo endógeno deste regulador de crescimento é adequado para promoção da germinação nesta espécie.

A conservação e propagação *in vitro* de plantas tem sido explorada por possibilitar maior controle sobre a sanidade do material propagado e possibilitar rápida multiplicação, em qualquer época do ano, a partir de explantes mantidos *in vitro* (OLIVEIRA, DIAS, BRONDANI, 2013). Além disso, esta alternativa de cultivo pode também auxiliar no conhecimento da fisiologia da planta (LIMA et al., 2008). Neste sentido, o sucesso de um protocolo de multiplicação *in vitro* depende de fatores, como tipo de explante, genótipo, regulador de crescimento e sua concentração, meio de cultura, condições de cultivo *in vitro*, dentre outros fatores (PEREIRA et al., 2015). No presente estudo, o potencial de brotação em explantes de *C. antisiphilitica* a partir de segmento nodal foi significativamente melhor que os demais tipos de explantes (Figura 13A).

Este tipo de explante também foi utilizado com sucesso em estudos de organogênese direta em outras espécies de ipês como *H. chrysotrichus* (PEREIRA et al., 2015) e *H. heptaphyllus* (DUARTE, SANSBERRO, LUNA, 2016), com indução de brotações a partir de segmentos nodais contendo as gemas laterais, o que justifica a utilização das gemas laterais axilares neste trabalho.

Em relação ao tipo de citocinina, BAP foi significativamente melhor para indução de brotações em explantes de *C. antisyphilitica* em comparação com KIN, TDZ e 2iP (Figura 14A). Contudo, não houve diferença significativa para o comprimento do maior broto (Figura 14B). Estes resultados são relevantes uma vez que BAP é a citocinina sintética de menor custo, em relação às demais fontes deste regulador de crescimento (XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013 et al., 2013). Por outro lado, existe uma capacidade diferencial dos tecidos vegetais em metabolizar reguladores de crescimento naturais e sintéticos (ROSSI e SARTORETTO, 2013), o que pode ocasionar resultados diferentes mesmo entre espécies da mesma família.

A utilização de BAP no meio de cultura prejudicou o estabelecimento *in vitro*, a formação de brotos, e também o enraizamento em *H. chrysotrichus*, além de aumentar consideravelmente a formação de calos (PEREIRA et al., 2015). Já para a alta taxa de sobrevivência dos explantes expostos às diferentes citocininas em relação ao tratamento controle (Figura 14C), a explicação pode estar associada ao fato de que a senescência é um processo regulado pelo balanço entre etileno e citocinina nos tecidos vegetais (OLIVEIRA et al., 2007). Deste modo, a suplementação de citocininas no meio de cultura retardou a senescência, assim como observado em *Alstroemeria* (Ferrante et al., 2002) e *Brassica oleracea* L. (DOWNS et al., 1997). Entretanto, a competência para retardar a senescência dos tecidos varia amplamente entre os diversos tipos de citocininas (GENKOV et al., 1997).

A temperatura ótima para germinação e cultivo de uma planta pode ser resultado da sua adaptação fisiológica às condições ambientais dos locais de ocorrência natural. Desta forma, pode haver relação direta entre a temperatura ótima de cultivo de *C. antisyphilitica* em relação à sua ocorrência predominante no Cerrado, para indução de brotações *in vitro*. Entretanto, na tentativa de otimização da indução de brotações em *C. antisyphilitica*, não houve diferença significativa entre as duas temperaturas testadas (25 °C e 35 °C). Por outro lado, as gemas provenientes de plantas matrizes mais jovens (30 dias de cultivo *in vitro*), expostas a 8,0 mg.L⁻¹ de BAP, apresentaram melhores resultados para indução de brotações *in vitro*, com média de 6 brotações

por explante (Figura 15D e 15E). A comum aplicação de citocininas no meio de cultura evidencia seu importante papel como reguladores de crescimento na estimulação de gemas axilares, uma vez que o desenvolvimento da brotação depende da relação de auxinas e citocininas (CORTEZI e COLLI, 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Além disso, explantes mais jovens como segmentos nodais de plântulas, têm sido mais eficientes para indução de brotações, com menor adição exógena de citocininas (JUNIOR et al., 2012).

A formação de raízes adventícias nas brotações obtidas no estágio de multiplicação, permite a constituição de plantas completas, para posterior transferência as condições *ex vitro* (RADMANN et al., 2009). Neste sentido, embora existam espécies que formam raízes adventícias *in vitro* apenas com os níveis endógenos de auxina, geralmente é necessário suplementar o meio de cultura com auxina para estimular a rizogênese *in vitro* (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). No presente estudo, o tratamento com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB apresentou cerca de 76% de enraizamento (Figura 16A), e também as melhores médias de comprimento de raiz com 24,96 mm (Figura 16B). Desta forma, embora o AIA seja a principal auxina das plantas, neste estudo, o AIB proporcionou melhores resultados, e tem sido a auxina mais recomendada para rizogênese *in vitro*, devido a sua maior fotoestabilidade, além do custo reduzido (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009; SOARES et al., 2014). Contudo, houve formação de massas calogênicas na base dos explantes expostos às auxinas, possivelmente por não ter sido realizada uma etapa complementar para limpeza, retirando o excesso de citocinina utilizada na etapa anterior.

Muitas vezes, as raízes formadas *in vitro* não apresentam características adequadas às funções de absorção, determinando, dentre outros fatores, a morte das mudas, quando transferidas para o solo ou substrato (RADMANN et al., 2009; HARTMANN et al., 2011). Desta forma, o enraizamento *ex vitro* diretamente no substrato apresenta vantagens como aumento da sobrevivência e do desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*, reduzindo o tempo e os custos de produção (AUGUSTO et al., 2006). Entretanto, no presente estudo, o transplântio das brotações diretamente no substrato, reduziu a sobrevivência ao processo de aclimatização, chegando a 9% no substrato vermiculita, mostrando-se fundamental nesta etapa do protocolo (Tabela 6).

A taxa de mortalidade das plantas transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro* é frequentemente elevada devido ao dessecamento (HARTMANN et al., 2011). Além do estresse

provocado pela perda excessiva de água, existe o estresse da mudança do metabolismo essencialmente heterotrófico das plantas para o autotrófico (BATAGIN, 2009; PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Desta forma, o processo de aclimatização pode causar estresse para as plantas, tornando-se um fator limitante na elaboração de um protocolo de micropropagação (SKREBSKY et al., 2006; HARTMANN et al., 2011; PINHAL et al., 2011). No presente estudo, as brotações de *C. antisiphilitica* previamente enraizadas *in vitro* e transplantadas para o substrato comercial alcançaram 60% de percentual de sobrevivência, o que foi significativamente maior que os demais tratamentos (Tabela 8). Contudo, além do enraizamento prévio, outros fatores podem estar relacionados ao sucesso da etapa de aclimatização, como a redução na densidade estomática, evitando a dessecação (HARTMANN et al., 2011).

Durante o processo de aclimatização das plantas crescidas *in vitro*, ocorrem mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas, tornando-as capazes de crescer nesse novo ambiente (ROCHA et al., 2008; HARTMANN et al., 2011). Em angiospermas, os estômatos não funcionais são citados como uma das causas da mortalidade de plantas transferidas de um ambiente *in vitro* para um *ex vitro* (VILLA et al., 2006). Pela avaliação da densidade estomática de *C. antisiphilitica*, verificou-se redução significativa entre plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas o que pode ter contribuído para o sucesso da aclimatização (Figura 18). Para *C. antisiphilitica*, Ortolani et al. (2008) afirmam que os estômatos são encontrados somente na face abaxial da folha. Isto está de acordo com Silva et al. (2009) que afirmam que os estômatos ocorrem na face abaxial da lâmina foliar na maioria das espécies da família Bignoniaceae, exceto em *T. aurea*, que apresenta estômatos em ambas as faces. Entretanto, poucos estudos foram realizados a fim de caracterizar os efeitos do cultivo *in vitro* sobre as alterações estomáticas durante a aclimatização de plantas em espécies desta família. Desta forma, apesar da densidade estomática ser considerada um fator de alta plasticidade em decorrência da exposição das plantas a diferentes ambientes, em *H. serratifolius* não houve diferença estatística para densidade estomática entre plantas propagadas *in vivo* e durante a aclimatização (DOUSSEAU et al., 2008).

5 CONCLUSÕES

Para germinação de sementes e estabelecimento *in vitro* de plantas matrizes de *C. antisiphilitica* recomenda-se a utilização de meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, sem necessidade de suplementação com GA₃.

Para indução de brotações *in vitro* de *C. antisiphilitica* recomenda-se a utilização de segmento nodal como explantes, contendo um par de gemas axilares e sem as folhas, que devem ser excisados de plantas com 30 dias de cultivo, e inoculados em meio de cultura MS suplementado com 8,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Recomenda-se o enraizamento *in vitro* das brotações de *C. antisiphilitica* em meio de cultura MS, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB, sem a necessidade de etapas adicionais para alongamento das brotações. Posteriormente, para aclimatização, o transplântio das brotações enraizadas deve ocorrer em substrato comercial.

6 REFERÊNCIAS

- AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 473-476, 2006.
- BATAGIN, K. D. et al. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiros cv. IAC Gomo-de-mel micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botânica Brasília**, v. 23, n. 1, p. 85-92, 2009.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.
- CLEMENTE, M. A. et al. Avaliação do potencial de plantas medicinais no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 516-518, 2008.
- CORTEZI, D. G.; COLLI, S. Effect of flooding and application of plant growth regulators on sprouting of *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) and *Sesbania virgata* (Fabaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 3, p. 423-430, 2011.
- DOUSSEAU, S. et al. Leaf anatomy of *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich.(Bignoniaceae) propagated *in vitro*, *in vivo* and during the acclimatization. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.

- FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In: Plant propagation by tissue culture. **Springer Netherlands**, p. 65-113, 2008.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.
- LELES, P. S. S. et al. Qualidade de mudas de quatro espécies florestais produzidas em diferentes tubetes. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 69-78, 2006.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4a edição. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, v. 1, p. 384, 2008.
- MCCOWN, B.; LLOYD, G. Woody plant medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species. **HortScience**, v. p. 453-453, 1981.
- MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, v. 1, n. 1, p. 57-62, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, L. S. D.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.
- OLIVEIRA, LM de et al. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 25-30, 2007.
- ORTOLANI, F. A. et al. Morfo-anatomia de plântulas e número cromossômico de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart.(Bignoniaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 2, p. 345-353, 2008.
- PEREIRA, M. D. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex a. dc.) Mattos. **Nativa**, v. 3, n. 1, p. 59-63, 2015.
- PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
- RADMANN, E. B. et al. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp.'GXN-9'. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 2, 2009.

- RAMOS, M. P. P. et al. Computer-aided identification of chemical constituents isolated from *Cybistax antisyphilitica*. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, v. 2, p. 000-000, 2003.
- ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 2008.
- RODRIGUES, A. M. S. et al. Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p. 755-757, 2005.
- ROSSI, E.; SARTORETTO, L. M. Propagação *in vitro* da farinha-seca. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 73, p. 45-52, 2013.
- SILVA, A. M. L. et al. Anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de ipês. **Hoehnea**, v. 36, n. 2, p. 329-338, 2009.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, 2006.
- SOARES, F. P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1847-1852, 2009.
- SOARES, T. D. C. et al. Quitosana e fitorreguladores na indução da organogênese direta em cultivar de algodão colorido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 839-843, 2014.
- SOUZA, A. C. et al. Cryopreservation and optimization of *in vitro* germination of *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1083, p. 481-483, 2015.
- TEAM, R. D. C. **R Development Core Team: R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011.
- VIANI, R. A. G.; RODRIGUES, R. R. Sobrevivência em viveiro de mudas de espécies nativas retiradas da regeneração natural de remanescente florestal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1067-1075, 2007.
- VILLA, F. et al. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 47-53, 2006.

ARTIGO 3 - Caracterização das massas calogênicas de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith e *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Martius (Bignoniaceae)

RESUMO

A calogênese vegetal é uma fonte alternativa de material biológico asséptico para vários estudos, como por exemplo, a produção de metabólitos secundários *in vitro*, e a embriogênese somática. Objetivou-se caracterizar as massas calogênicas de *T. roseoalba* e *C. antisyphilitica*, para fins de conservação e estimular pesquisas futuras de embriogênese somática indireta e exploração de metabólitos secundários para fins farmacêuticos. Para calogênese de *C. antisyphilitica* recomenda-se a utilização de hipocótilo ou folha cotiledonar como explantes, inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA. A curva de crescimento dos calos de ambas espécies a partir do explante folha cotiledonar, apresentou crescimento do tipo sigmoidal, com fase estacionária ocorrendo 30 dias após a inoculação. Em *T. roseoalba* houve maior frequência de calos com coloração marrom escura, enquanto para calos de *C. antisyphilitica* as frequências de colorações foram mais claras. O escurecimento dos calos em ambas espécies esteve diretamente correlacionado à peroxidação lipídica. Além disso, a viabilidade dos calos em ambas espécies mostrou-se decrescente, a partir dos calos brancos, seguido dos calos de coloração branco-amarronzados e marrom escuro. Em calos de coloração branca de *T. roseoalba* houve grande quantidade de células pequenas e isodiamétricas, contudo, para *C. antisyphilitica*, houve maior proporcionalidade de células alongadas e com membranas rompidas. Desta forma, os calos de ambas espécies apresentaram baixo potencial embriogênico nas condições deste estudo.

Palavras-chave: Propagação Vegetativa, Ipê-branco, Ipê-verde, Plantas medicinais, Cerrado.

1 INTRODUÇÃO

A calogênese vegetal é uma fonte alternativa de material biológico asséptico para vários estudos, como por exemplo, a produção de metabólitos secundários *in vitro*, e a embriogênese somática indireta (CARTER e GUNAWARDENA, 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando embriões que darão origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas, e pode ser induzida por meio de técnicas da cultura de tecidos para fins de conservação e multiplicação clonal (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). A propagação vegetal por meio da embriogênese somática de algumas espécies lenhosas tem sido reportada com sucesso, tanto por via direta, quanto indireta, como por

exemplo, em *Tabebuia ochracea* (COSTA et al., 2004), *Handroanthus chrysotrichus* (BITTENCOURT e MORAES, 2010) e *Handroanthus serratifolius* (FERNANDES, 2015). Além disso, o cultivo *in vitro* de células e tecidos de plantas medicinais, permite a produção de biomassa e exploração de metabólitos secundários de interesse por meio do cultivo de biótipos específicos que podem ter dificuldade de propagação fora de seus ecossistemas de origem (FUMAGALI et al., 2008; ALMEIDA et al., 2016), justificando o advento dos estudos relacionados a calogênese e embriogênese somática indireta de diversas espécies.

Tanto na embriogênese somática indireta quanto em estudos de calogênese, é importante a caracterização das massas calogênicas, e dos processos de transição de células somáticas para o estado embriogênico, os quais podem ser induzidos por certas condições *in vitro* (CARNEIRO et al., 2014; FEHÉR, 2015). Neste sentido, é necessário chegar ao balanço ideal entre vários fatores como reguladores de crescimento, potencial osmótico, pH, aminoácidos, sais e vitaminas, e todo esse processo é bastante específico, além de demandar tempo e mão de obra qualificada (JIMÉNEZ, 2001; GEORGE, HALL e KLERK, 2008; CARNEIRO et al., 2014).

Tabebuia roseoalba (Ipê-branco) e *Cybistax antisyphilitica* (Ipê-verde) pertencem a família Bignoniaceae, e podem ser micropropagadas *in vitro* por meio da embriogênese somática indireta para fins de conservação. Contudo, estudos relacionados a propagação *in vitro* destas espécies ainda são incipientes. Trata-se de espécies nativas do Cerrado, muito requisitadas para uso paisagístico, arborização urbana e frequentemente exploradas de forma predatória e indiscriminada por suas propriedades medicinais (RODRIGUES et al., 2005, GARKAVTSEV et al., 2011; OLIVEIRA e NETO, 2012). Além disso, o Cerrado, onde predomina a ocorrência destas espécies é o segundo maior bioma brasileiro em extensão, considerado o mais ameaçado do país, e um dos 34 hotspots ambientais mundiais, considerado atualmente como área crítica para conservação, o que justifica esforços para conservação e propagação destas espécies (MYERS et al., 2000).

Por sua relevância, alguns trabalhos utilizando técnicas de cultura de tecidos foram realizados para *T. roseoalba*. Abbade et al. (2009) compararam a estrutura interna e externa de folhas de *T. roseoalba* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, e verificaram que folhas de plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram menor densidade estomática e maior número de tricomas, que plantas cultivadas *in vitro*. Mais adiante, Porto (2014) comparou a estrutura anatômica entre folhas de plântulas germinadas *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos, e verificou que as

plântulas aclimatizadas com substrato comercial apresentaram-se maiores, com maior espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Em outro estudo, Abbade et al, (2010) determinaram a curva de crescimento de calos de *T. roseoalba*, com comportamento sigmoidal, bem como a sua caracterização bioquímica. Além disso, Reis et al. (2013) trabalhando com o cultivo *in vitro* da mesma espécie, encontraram calos com potencial embriogênico provenientes de folhas cotiledonares cultivadas *in vitro*, em exposição ao regulador de crescimento α -naftalenoacético (ANA). Por outro lado, não há relatos de protocolos de micropropagação de *C. antisiphilitica* na literatura. Desta forma, objetivou-se caracterizar as massas calogênicas de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, visando sua conservação e estimular pesquisas futuras de embriogênese somática, melhoramento genético e exploração de metabólitos secundários para fins farmacêuticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e estabelecimento *in vitro*

Sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith e *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Martius foram fornecidas pelo Viveiro de Mudas Nordeste LTDA, Arcos – MG. As sementes foram coletadas na região sul de Minas Gerais, entre os meses de outubro e dezembro de 2015, e armazenadas em sacos de papel a ± 4 °C até serem enviadas para o laboratório. Após remoção manual das alas, a fim de minimizar as contaminações, as sementes foram lavadas com detergente e água corrente durante 20 minutos com subsequente desinfestação. O procedimento de desinfestação ocorreu em câmara de fluxo laminar por meio da imersão das sementes em álcool 70% durante 1 minuto, e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, durante 10 minutos conforme Souza et al. (2017). As sementes sem alas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃ - Sigma®). Os tubos de ensaio contendo as sementes foram transferidas para sala de crescimento, e mantidos sob luz fluorescente branca, com densidade de fluxo de fótons de 67 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de 25 ± 2 °C.

2.2 Teste de explante para calogênese

Para calogênese de *C. antisiphilitica*, foram testados os explantes raiz, hipocótilo e folhas cotiledonares, os quais foram excisados de plantas com 30 dias de cultivo *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com ácido naftalenoacético (ANA - Sigma[®]) ou ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D - Sigma[®]) em diferentes concentrações (2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹). Como controle foi utilizado o mesmo meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 120 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Avaliou-se o percentual de formação de calos em cada tratamento, aos 30, 45 e 60 dias de cultivo *in vitro*, em esquema fatorial triplo (explantes x auxinas x concentrações), sendo 15 explantes por tratamento, e delineamento estatístico totalmente casualizado. Já para *T. roseoalba*, após 20 dias de cultivo *in vitro*, foi realizada a excisão dos explantes de folhas cotiledonares (0,25 cm²), e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS, acrescido de 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar (Sigma[®]) e suplementado com 6,0 mg.L⁻¹ de ANA (Sigma[®]) (REIS et al., 2013).

2.3 Curva de crescimento dos calos

Com base nos experimentos anteriores, para determinação da curva de crescimento dos calos, foi selecionado o explante folha cotiledonar (com área média de 0,25 cm²) para ambas espécies. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS, suplementado com 6,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹ de ANA (Sigma[®]), para *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, respectivamente. Para determinação da massa fresca e massa seca dos calos, procedeu-se a pesagem dos explantes em balança analítica de precisão no momento da inoculação, e, posteriormente, em intervalos de cinco dias, durante 40 dias de cultivo *in vitro*. Para determinação dos pesos em cada ponto da curva obteve-se a média de 10 explantes/calos por intervalo, de forma que, para massa seca, o material passou por secagem em estufa de circulação fechada de ar à 70 °C até atingir peso constante (REIS et al., 2013).

2.4 Classificação visual da coloração

Para avaliação das diferentes colorações dos calos foram realizados 3 subcultivos a cada 30 dias, durante 90 dias, para obtenção de 100 calos para cada espécie. Após esse período, foi realizada a classificação dos calos em relação às suas colorações, considerando como branco (B), branco-amarronzado (BA) e marrom escuro (M). Essa classificação foi realizada por 3 avaliadores distintos (REIS et al., 2013).

2.5 Teste de viabilidade

Após a classificação de cores dos calos, avaliou-se a viabilidade celular das massas calogênicas por meio do teste de Tetrazólio. Para tal, procedeu-se 5 amostragens de 0,5 gramas de cada cor apresentada, e para cada uma das espécies, em delineamento inteiramente casualizado. As massas calogênicas foram acondicionadas em eppendorffs contendo 1 mL de solução de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) à concentração de 0,5%, preparados em tampão fosfato a 10 mM e pH 7,0, e encubados durante 15 horas no escuro, em câmara de germinação tipo B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio), ajustada para 30 °C. Após esse período, foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 1 minuto, descartando-se o sobrenadante. Para extração do composto Formazan, foi adicionado 1 mL de etanol 94% (v/v) em cada eppendorff, seguido de incubação em banho-maria à 80 °C sob agitação, por 5 minutos. Após extração, o material foi novamente centrifugado a 4.000 rpm durante 2 minutos, sendo o sobrenadante reservado para as leituras de absorvância a 487 nm de comprimento de onda, em espectrofotômetro Beckman DU®. A curva padrão da absorvância de calos foi obtida com cinco leituras de absorvância do Formazan para cada ponto da curva, sendo a viabilidade celular expressa em absorvância/g de peso fresco de acordo com Benson (1994).

2.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica dos calos foi determinada para cada coloração observada, e em ambas espécies, por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme Buege e Aust (1978). Para tanto, 0,2 g de calos foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético

(TCA) a 20% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 rpm, por 10 minutos. Alíquotas (0,75 mL) do sobrenadante foram adicionadas a 0,75 mL de TBA. Em seguida, os tubos foram fervidos a 90°C, durante 20 minutos. Após a fervura, os tubos foram resfriados rapidamente em banho de gelo e as leituras determinadas em espectrofotômetro Beckman DU[®], a 540 nm. A concentração do complexo malonaldeído (MDA)/ácido tiobarbitúrico (TBA) foi calculada pela equação: $[MDA] = (A535 - A600) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1).

2.7 Análise histológica

Amostras de 0,5 g de cada uma das colorações de calos de ambas espécies foram coletadas e espalhadas em lâminas de vidro com uma leve maceração. Em seguida, foram adicionadas três gotas do corante Azul de Evans 0,5%, o qual permaneceu em reação por três minutos. Após esse período, foi retirado o excesso de corante e adicionado três gotas de Carmim acético 2%, o qual permaneceu em reação pelo mesmo tempo (DURZAN, 1988). Por fim, o excesso de corante foi retirado, a massa celular distribuída sobre a superfície da lâmina e analisadas em microscópio óptico com câmera digital acoplada na objetiva de 5x, zoom operation, resolução de 1.6x e flash ausente. Registraram-se cinco campos distintos de melhor resolução em cada lâmina e as imagens digitalizadas foram avaliadas por meio da porcentagem de área corada medida pelo software AxioVision SE64 Rel.4.8. A calibração foi efetuada por meio da digitalização de lâmina micrometrada fornecida pelo fabricante do equipamento utilizado no mesmo aumento das fotografias.

2.8 Análise ultra-estrutural

Para observação das possíveis características embriogênicas, foi realizada análise ultra-estrutural das massas calogênicas, apenas para a coloração branca de ambas espécies. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia e análise Ultra-estrutural - UFLA, Lavras - MG. Aos 90 dias de cultivo *in vitro*, foram coletadas amostras de calos brancos, as quais foram imersas em solução fixadora Karnovsky (pH 7,2) por um período de 24 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,056 M três vezes por um período de 10 minutos cada e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05

M por 4 horas em temperatura ambiente. Após esse período, foram lavadas por 3 vezes em água destilada e, em seguida, realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), por 10 minutos e três vezes com 100%, por 10 minutos cada. Após a desidratação para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico CDP 030, por meio de CO₂ líquido e, então, montadas em stubs para metalização com ouro. Os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de varredura (LEO Evo 040), operando entre 10 e 20 kV.

2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), por meio do *software* estatístico R Core Team (2011), versão 3.4.0, via pacote ExpDes.pt. As variáveis que não atenderam às pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade dos resíduos, sofreram transformação por meio da raiz quadrada.

3 RESULTADOS

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o percentual de formação de calos em explantes de *C. antisiphilitica*, entre 30, 45 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Por outro lado, os explantes hipocótilo e folha cotiledonares foram significativamente ($p < 0,05$) melhores que raiz, para iniciação das massas calogênicas, independentemente do tempo de cultivo (Figura 19A). Além disso, o regulador de crescimento ANA foi significativamente ($p < 0,05$) melhor que o 2,4-D em todas as concentrações testadas, exceto para a concentração de 2,0 mg.L⁻¹, independentemente do tipo de explante (Figura 19B).

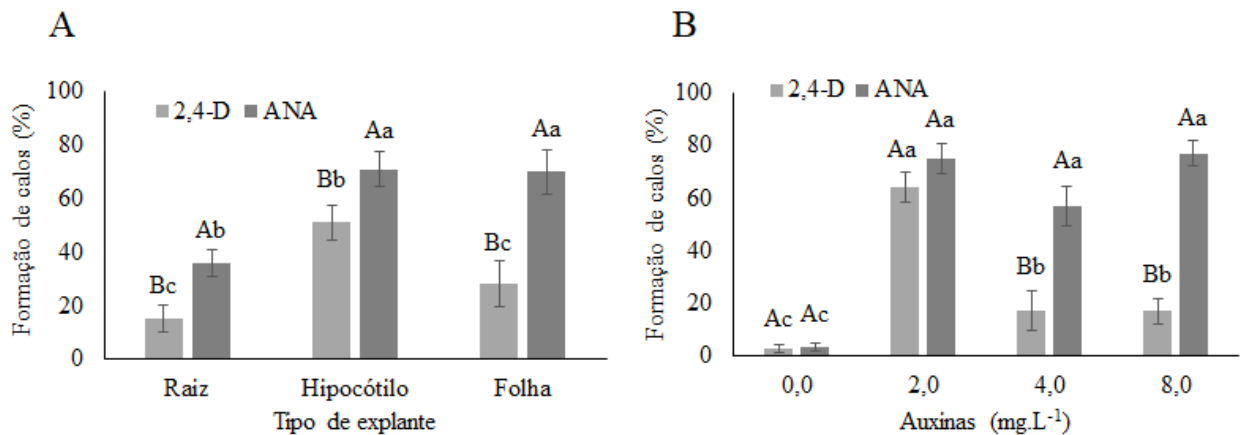


Figura 19 - Percentual de formação de calos de diferentes tipos de explantes de *C. antisiphilitica* (A) submetidos a diferentes auxinas (B). Letras maiúsculas comparam as médias dentro de cada explante (A) e concentração (B), e letras minúsculas comparam dentro de cada regulador de crescimento. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Com base nos experimentos anteriores, determinou-se o explante folha cotiledonar como padrão nos experimentos para ambas espécies. A curva de crescimento mostrou-se do tipo sigmoidal, com tendência de acúmulo de matéria seca em função do aumento no tempo de cultivo, sendo possível identificar as fases de crescimento dos calos em ambas espécies (Figura 20). A fase lag ocorreu nos primeiros 10 dias após a inoculação dos explantes, quando as células estão se preparando para a divisão. A fase de crescimento exponencial (fase biossintética), ocorreu entre 10 e 20 dias. A fase de desaceleração ocorreu entre os dias 20 e 30 dias e a fase estacionária ocorreu 30 dias após a inoculação. Maior incremento de matéria seca de calos foi obtida próximo aos 30 dias de cultivo para ambas espécies, com estabelecimento da curva ocorrendo após o 30º dia da inoculação. Ainda que tenha havido uma tendência de aumento de matéria seca para calos de *C. antisiphilitica* após o 30º dia de cultivo, foi observado um escurecimento dos calos nesta fase do cultivo.

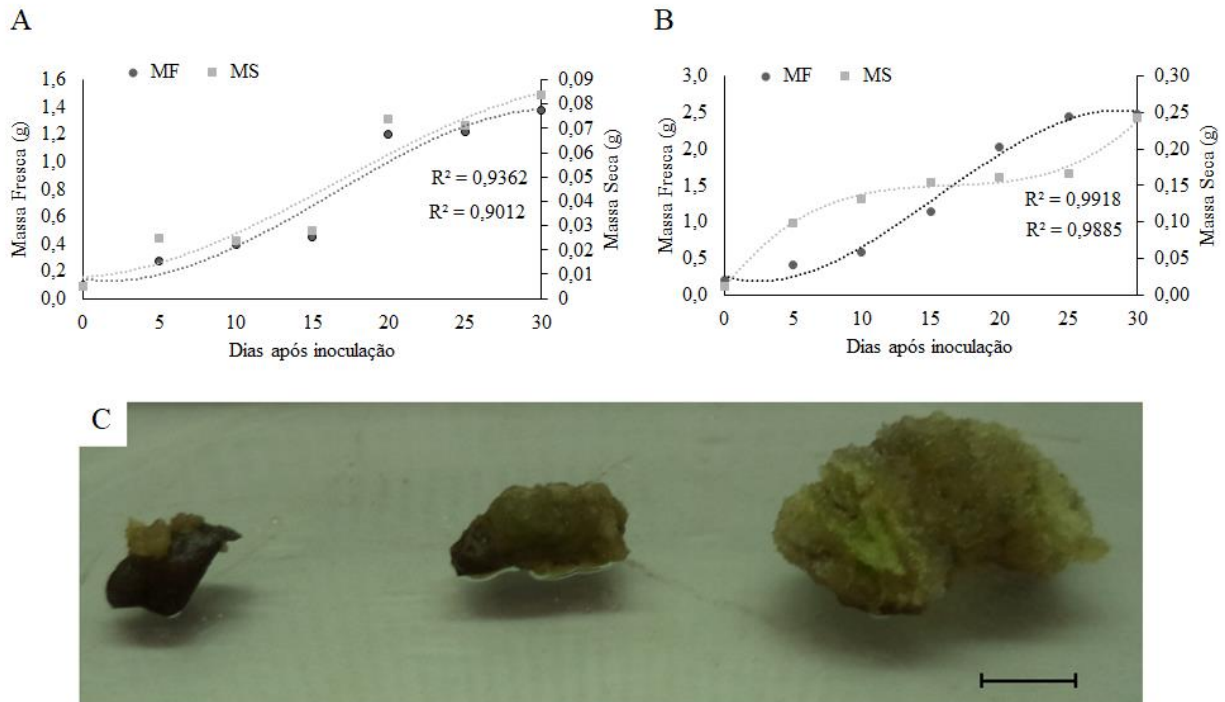


Figura 20 - Curva de crescimento de calos de *T. rosealba* (A) e de *C. antisiphilitica* (B). Amostras de calos de *T. rosealba* (C) aos 5 dias (esquerda), 10 dias (centro) e 25 dias (direita) de cultivo *in vitro*. Barra: 1,0 cm.

Com base na determinação da curva de crescimento, os calos de ambas espécies foram subcultivados em intervalos de 30 dias, durante 90 dias, quando procedeu-se a classificação visual das suas colorações. Desta forma, cerca de 85% dos calos de *T. rosealba* apresentaram coloração marrom escura (M), enquanto os calos de *C. antisiphilitica* apresentaram maior frequência de coloração clara com 46,7% e 45,3% nas cores branca (B) e branco-amarronzado (BA), respectivamente (Figura 21A). Além disso, foi verificada uma tendência ao aumento da peroxidação lipídica em calos escurecidos de ambas espécies, quando verificada a concentração de malonaldeído (MDA), de modo que, quanto mais escuro o calo, maior a peroxidação lipídica, em ambas as espécies (Figura 21B). Já para a viabilidade celular dos calos, por meio do teste de Tetrazólio, verificou-se uma absorvância de Formazan significativamente ($p < 0,05$) decrescente dos calos, indicando perda de viabilidade a partir dos calos brancos (B), seguido dos calos de coloração branco-amarronzados (BA) e marrom escuro (M), respectivamente, para ambas espécies (Figura 21C).

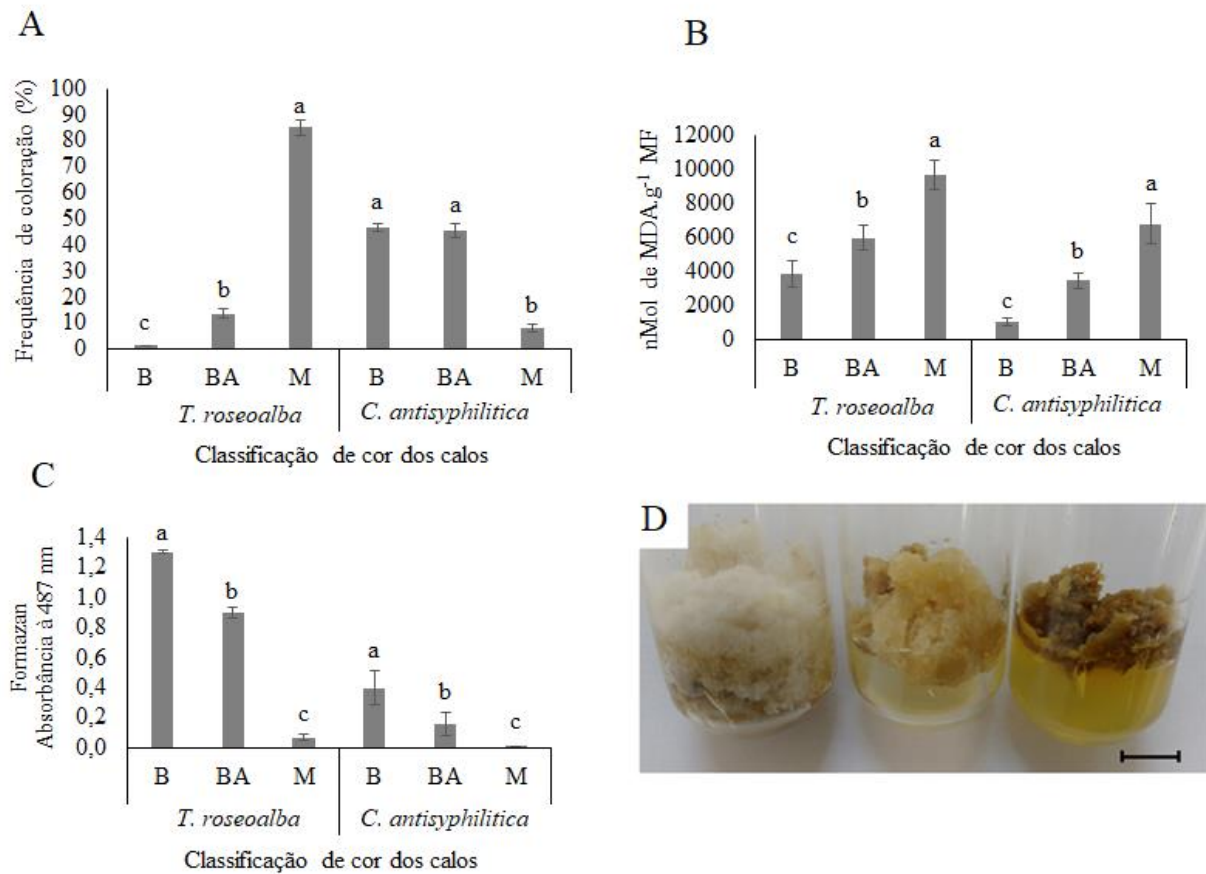


Figura 21 - Distribuição de frequência para classificação visual da coloração dos calos (A), concentração de malonaldeído (MDA) (B) e absorbância de Formazan à 487 nm (C) em relação as diferentes colorações dos calos de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, ao final de 3 subcultivos de 30 dias. Barras: erro padrão da média. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Observação visual de calos brancos (esquerda), branco-amarronzados (centro) e marrons (direita) conforme análise de 3 avaliadores distintos (D). Barra: 1,0 cm.

Apesar do potencial embriogênico dos calos de coloração branca em *T. roseoalba* se mostrar significativamente ($p < 0,05$) maior em relação às demais cores de calo, o teste de dupla coloração revelou um baixo potencial embriogênico para ambas espécies e em todas as colorações de calos apresentadas (Figura 22A). Para *C. antisiphilitica* os calos de coloração branca mostraram-se ainda menos embriogênicos que as demais colorações, uma vez avaliado o percentual de coloração da lâmina com Carmin acético pelo teste de dupla coloração (Figura 22B).

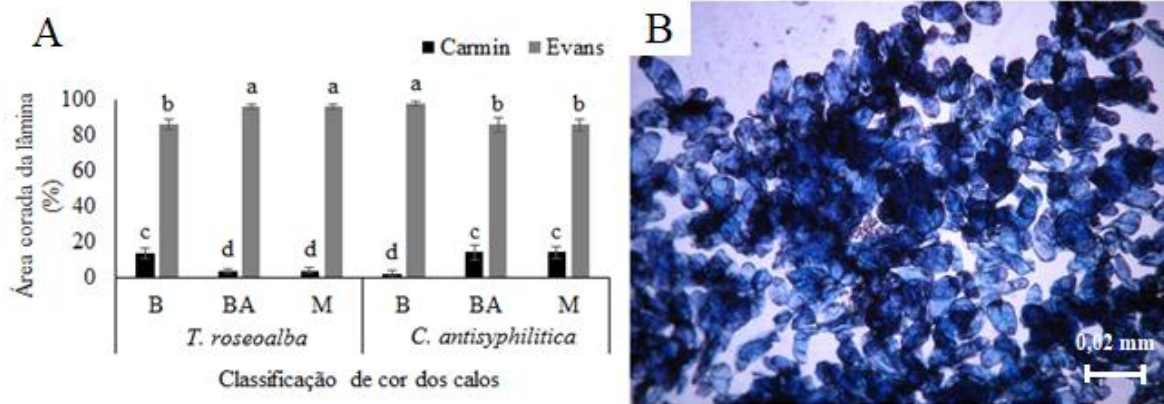


Figura 22 - Percentual de área corada das lâminas com Carmin acético e azul de Evans (A) em relação as diferentes colorações dos calos de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, ao final de 3 subcultivos de 30 dias. Barras: erro padrão da média. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Campo capturado por meio do software AxioVision SE64 Rel.4.8 e analisado por dupla coloração de calo de coloração branca de *C. antisiphilitica* (B). Barra: 0,02 mm.

Com base no teste de viabilidade, peroxidação e dupla coloração, procedeu-se a coleta e fixação apenas de calos de coloração branca de ambas as espécies, ao final de 30 dias de cultivo *in vitro* para análise ultra-estrutural por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise de MEV permitiu a observação de grande quantidade de células pequenas e isodiamétricas em calos de *T. roseoalba* (Figura 23A e 23B). Contudo, para calos de *C. antisiphilitica*, houve maior proporcionalidade de células alongadas e com membranas rompidas (Figura 23C e 23D).

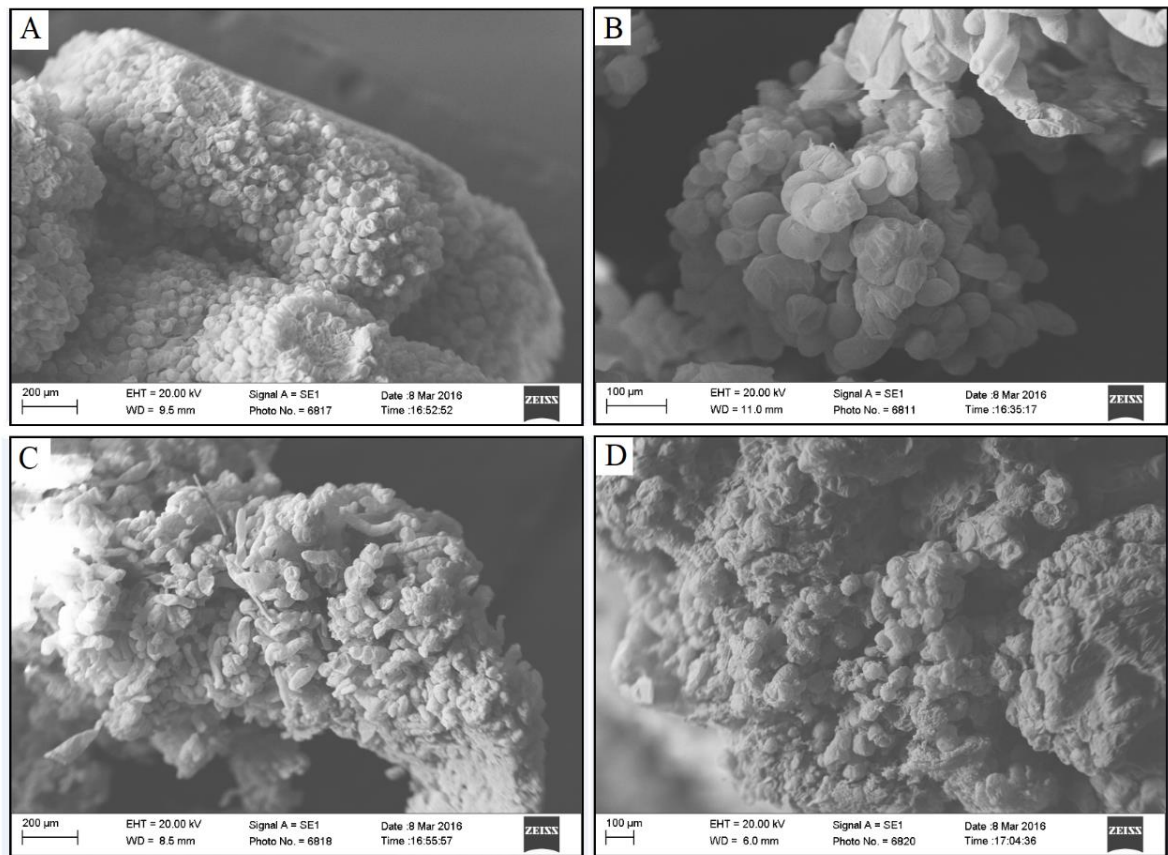


Figura 23 - Análise ultra-estrutural de calos de coloração branca de *T. roseoalba* (A e B) e de *C. antisiphilitica* (C e D) por meio de microscopia eletrônica de varredura.

4 DISCUSSÃO

As células vegetais apresentam grande capacidade de se diferenciar ou se desdiferenciar durante o ciclo de vida vegetal e desenvolvimento *in vitro* do organismo (AGRAWAL e SARDAR, 2007). Explantes jovens excisados de estruturas reprodutivas, como cotilédones e hipocótilos são em geral, os mais responsivos para calogênese e embriogênese somática devido ao seu estágio de diferenciação celular (LAMB et al., 2002; SUN et al., 2003). Além disso, em um mesmo genótipo, as células dos explantes podem ter sensibilidade diferente aos reguladores de crescimento, o que explica o fato de alguns explantes serem mais competentes para a embriogênese em comparação com outros tecidos vegetais (JIMÉNEZ, 2005). Desta forma, no presente estudo, os explantes hipocótilo e folha cotiledonar foram melhores para formação de calos em relação ao explante raiz (Figura 19A). Além disso, o regulador de crescimento ANA foi melhor que o 2,4-D para iniciação de calos em todos os tipos de explantes testados (Figura 19B).

Alguns estudos têm demonstrado que as auxinas ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) e α -naftalenoacético (ANA), estão diretamente envolvidas na indução e iniciação de calos pró-embriogênicos em espécies nativas do Cerrado como *T. roseoalba* (REIS et al., 2013).

Calos podem ser formados a partir de qualquer parte da planta (XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). Em estudos de calogênese é importante estabelecer a curva de crescimento dos calos, por meio da qual é possível determinar o momento ideal para repicagem do material em um meio de cultura fresco (PINHAL et al., 2011). Neste estudo, a curva de crescimento de calos por meio da utilização de explantes de folhas cotiledonares, apresentou comportamento sigmoidal típico (Figura 20A e 20B). Este tipo de crescimento *in vitro* de calos com padrão sigmoidal geralmente apresenta cinco fases bastante distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (GEORGE, HALL e KLERK, 2008; LAMEIRA et al., 2009).

Desta forma, a curva de crescimento de calos de ambas espécies foi determinada num período de 30 dias, sendo que, ao final deste período (fase estacionária), os calos já apresentavam-se mais escurecidos. Estes resultados corroboram com Reis et al., (2013) para *T. roseoalba*, contudo, o tempo para formação da curva de crescimento foi curto se comparado com outras espécies como *Bertholletia excelsa* (NOGUEIRA et al., 2007) e *Coffea sp.* (SANTOS; FERREIRA; SARUBO, 2010), nos quais a curva estabeleceu-se em 90 e 60 dias, respectivamente. Trabalhando com a mesma espécie, Abbade et al, (2010) verificaram que a curva de crescimento de matéria fresca de calos formados a partir de explantes foliares expostos a 2,4-D e KIN, também apresenta crescimento sigmoide, com cinco fases distintas. Contudo, os mesmos autores recomendam a repicagem dos calos para um novo meio de cultura entre 60° e 75° dias cultivo (ABBADE et al., 2010).

Diversos fatores podem influenciar na coloração dos calos cultivados *in vitro*, entre eles a concentração e o tipo do regulador de crescimento utilizado no meio de cultura (CARNEIRO et al., 2014). A alteração de parâmetros como coloração e textura de calos durante o cultivo *in vitro* têm sido utilizados como indicativos de sua capacidade regenerativa e embriogênica (RODRIGUES et al. 2009; CARNEIRO et al., 2014). Neste estudo, cerca de 85% dos calos de *T. roseoalba* apresentaram cor marrom escura (M), enquanto os calos de *C. antisiphilitica* apresentaram maior frequência de cores claras com 46,7% e 45,3% nas cores branca (B) e branco-amarronzado (BA), respectivamente (Figura 21A). Estes resultados de frequência de coloração são relevantes para estudos de calogênese e embriogênese somática pois indicam a taxa

de oxidação do material, bem como a sua viabilidade. Isto pode ser verificado em calos de *Passiflora gibertii* onde houve correlação da sua coloração mais clara com maior potencial morfogenético (CARVALHO, 2015).

O acúmulo de malondialdeído é frequentemente utilizado como indicador de danos às membranas celulares, uma vez que a peroxidação lipídica está relacionada à degradação oxidativa dos lipídios (SHARMA et al., 2012; ALVES et al., 2013). Contudo, a associação desta característica com as alterações de coloração em calos cultivados *in vitro* ainda é incipiente. Neste estudo, o aumento da peroxidação lipídica esteve diretamente correlacionado ao escurecimento do calo, de forma que quanto mais escuro o calo, maior a peroxidação lipídica, em ambas as espécies (Figura 21B). A peroxidação lipídica afeta severamente a funcionalidade e integridade celular e pode produzir danos irreversíveis à célula devido ao aumento na permeabilidade da membrana plasmática, que provoca o extravasamento de íons e outros solutos (ALVES et al., 2013). Desta forma, a classificação visual da coloração dos calos durante o cultivo *in vitro*, associado a oxidação dos tecidos, pode servir de embasamento para estudos futuros de calogênese e embriogênese somática.

Por meio do teste de Tetrazólio é possível inferir sobre o nível respiratório das amostras testadas, com base na atividade enzimática de células vivas, e assim determinar sua viabilidade (ARTIOLI-COELHO et al., 2015). Desta forma, amostras biológicas que apresentam maior taxa respiratória, quando incubadas em tetrazólio, formarão maiores quantidades de Formazan e assim terão valores de absorbância significativamente maiores (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2018). Para calos de coloração branca de *T. roseoalba* a absorbância de Formazan foi alta, com média de 1,311, enquanto para calos brancos de *C. antisiphilitica* a absorbância foi em torno de 0,396 (Figura 21C). Utilizando-se do teste de Tetrazólio para caracterização de massas pró-embriogênicas de calos de *Byrsonima crassifolia*, foi verificado uma absorbância média de 0,588 (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2018). Já para calos de *Musa spp.* (cv. Prata anã), o mesmo tipo de análise obteve valores de absorbância em torno de 0,937 (LIMA, 2008). Da mesma forma, houve uma redução na viabilidade celular a partir do terceiro subcultivo de calos de *Byrsonima crassifolia*, analisando-se a absorbância de Formazan (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2018). Além disso, uma alta taxa respiratória das células verificadas por meio do teste de Tetrazólio pode indicar um estágio de morte celular programada como verificado em calos de *Passiflora gibertii*, após 30 dias de subcultivo (ARTIOLI-COELHO et al, 2015).

Apesar da utilização da dupla coloração (Carmim acético/azul de Evans) para identificação de calos com potencial embriogênico ter sido relatada com sucesso para várias espécies como por exemplo *Byrsonima intermedia* (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2018) e *Jatropha curcas* (SANTOS, 2010), sua utilização ainda é controversa. Desta forma, em *T. roseoalba* e *Passiflora cincinnata* foi confirmada a presença de massas pró-embriogênicas, por meio da coloração com o corante Carmim acético, onde uma grande porção de células apresentaram coloração vermelha intensa (SILVA et al., 2012; REIS et al., 2013; SILVA et al., 2018). Contudo, no presente estudo, apesar do maior potencial embriogênico dos calos de coloração branca em *T. roseoalba* em relação as demais colorações de calos, o teste de dupla coloração revelou um baixo potencial embriogênico para ambas espécies e em todas as colorações de calos apresentadas com alta percentagem de coloração azul das células avaliadas (Figura 22A). Para *C. antisiphilitica* os calos brancos mostraram-se ainda menos embriogênicos que as demais colorações observadas (Figura 22B). Desta forma, outros métodos têm sido utilizados para determinar o potencial embriogênico de calos como a microscopia eletrônica de varredura para análise ultra-estrutural.

A análise ultra-estrutural por meio de microscopia eletrônica de varredura permite o conhecimento detalhado das células e das camadas de tecidos envolvidos nos eventos morfogenéticos (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2018). Neste estudo, por meio da análise ultra-estrutural dos calos, foi possível observar grande quantidade de células pequenas e isodiamétricas em calos brancos de *T. roseoalba*, sugerindo alto potencial embriogênico dos calos (Figura 23A e 23B). Contudo, para calos de coloração branca de *C. antisiphilitica* houve maior predominância de células alongadas e com membranas rompidas, indicando baixo potencial embriogênico (Figura 23C e 23D). Estes resultados corroboram com o teste de dupla coloração e são relevantes pelo fato de que os calos embriogênicos, em geral, são compostos por células pequenas e de formato isodiamétrico, as quais são capazes de produzir embriões somáticos (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; STEINER et al. 2016). Da mesma forma, essa ferramenta foi utilizada com sucesso para o esclarecimento da capacidade morfogenética de explantes de *Jatropha curcas* cultivados *in vitro* (SANTOS, 2010) e do potencial embriogênico de calos de *T. roseoalba* (REIS et al., 2013).

5 CONCLUSÕES

Para calogênese de *C. antisiphilitica* recomenda-se a utilização de hipocótilo ou folha cotiledonar como explantes, inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA.

Em *T. roseoalba* houve maior frequência de calos com coloração marrom escura, enquanto para calos de *C. antisiphilitica* as frequências de colorações foram mais claras. O escurecimento dos calos em ambas espécies esteve diretamente correlacionado à peroxidação lipídica e a viabilidade dos calos em ambas espécies.

Os calos apresentaram baixo potencial embriogênico nas condições deste estudo, para ambas espécies.

6 REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C. et al. Anatomia foliar de Ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand.) Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.
- ABBADE, L. C. et al. Growth curve and biochemical analyses of callus of Ipe-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, v. 33, p. 45-56, 2010.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ARTIOLI-COELHO, F. A. et al. Vitamin C and total phenols quantification in calli of native passion fruit induced by combinations of Picloram and Kinetin. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 8, p. 1459-1465, 2015.
- BENSON, E. E. Cryopreservation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. 2.ed. Oxford: IRL, 1994. Cap.7, p. 147-167.
- BITTENCOURT, N. S.; MORAES, C. I. G. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. áochraceus*, Bignoniaceae): a histological study of postpollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, n. 1-2, p. 59-76, 2010.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p. 302-310, 1978

CARNEIRO, F. S. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, 2014.

CARTER, J.; GUNAWARDENA, A. H. Regeneration of the aquatic monocot *Aponogeton madagascariensis* (lace plant) through callus induction. **Aquatic botany**, v. 94, n. 3, p. 143-149, 2011.

CARVALHO, M. A. F. et al. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Ceres**, v. 62, n. 4, p. 340-346, 2015.

COSTA, M. E. et al. Polyembryony and aspects of embryogenesis in *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 395-406, 2004.

DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. **University of Agricultural Sciences**, 1988. p.147-186.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis-stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FERNANDES, A. C. Propagação vegetativa e estabelecimento *in vitro* de *Swietenia macophylla* King e *Handroanthus serratifolius* (Vahl) SO Grose. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2015.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In: Plant propagation by tissue culture. **Springer Netherlands**, p. 65-113, 2008.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 1/2, p. 91-110, 2005.

LAMB, C. R. C. et al. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 123-130, 2002.

LAMEIRA, O. A. et al. Establishment of cell suspension cultures and flavonoid identification in *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2009.

LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4ª edição. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, v. 1, p. 384, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007a.
- NOGUEIRA, R. et al. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de Murici-pequeno (*Brysonima intermedia* A. Juss). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 48-50, 2007b.
- OLIVEIRA, E. R.; NETO, L. M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte-MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.
- PEREIRA, M. D. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex a. DC.) Mattos. **Nativa**, v. 3, n. 1, p. 59-63, 2015.
- PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
- PORTO, J. M. P. et al. Anatomical analyses of *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae) seedlings during acclimatization process. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 8, n. 7, p. 257-264, 2014.
- REIS, M. et al. Cytochemical and ultrastructural analysis of pro-embryogenic masses in *Tabebuia roseo-alba*. **Acta Horticulturae**, v. 988, p. 186-213, 2013.
- RODRIGUES, M. et al. Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, P. 21-26, 2009.
- SANTOS, D. N. et al. Análise bioquímica de calos de pinhão manso. **Ciência Rural**, v. 40. p. 2268-2273, 2010a.
- SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in conilon coffee. **Revista Caatinga**, v. 23, p. 133-136, 2010b.
- SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p.1-26, 2012.
- SILVA, D. P. C. et al. Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: induction and maturation via indirect approach. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 1, p. 115-122, 2018.

- SILVA, L. C. et al. Cell Viability of *Byrsonima intermedia* A Juss Calli. **Journal of Agricultural Science and Technology**. B, v. 2, n. 6B, p. 713, 2012.
- SOUZA, A. et al. Cryopreservation and optimization of *in vitro* germination of *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1083, p. 481-483, 2015.
- SOUZA, A. C. et al. *In vitro* organogenesis in *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1, p. 177-184, 2017.
- STEINER, N. et al. Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 487-501, 2016.
- SUN, Y. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, n. 3, p. 247-253, 2003.
- TEAM, R. D. C. **R Development Core Team: R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011.
- UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., STAUFFER, J. R. **Method for glucose determination and other sugars**. Burgess Publishing Co, 4 ed, 1964.
- XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

ARTIGO 4 - Criopreservação de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith e *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Martius (Bignoniaceae)

RESUMO

Pertencentes à família Bignoniaceae, *Tabebuia roseoalba* (Ipê-branco) e *Cybistax antisyphilitica* (Ipê-verde) são árvores nativas do Cerrado, comumente exploradas por suas propriedades medicinais, paisagismo, arborização urbana, e muito requisitadas em programas de recomposição vegetal de áreas degradadas. Contudo, em espécies florestais nativas é comum a ocorrência de sementes com baixa longevidade natural, o que dificulta sua utilização fora da época de produção. Objetivou-se estabelecer um protocolo de criopreservação para sementes de *T. roseoalba* e *C. antisyphilitica*. Após o beneficiamento, sementes de cada espécie foram criopreservadas em nitrogênio líquido (+LN), enquanto outras foram mantidas em temperatura ambiente (-LN) e utilizadas como controle. Após 1 hora de imersão em nitrogênio líquido (NL), as sementes foram descongeladas em banho-maria a 38 °C por 3 minutos, com subsequente desinfestação e inoculação. A criopreservação de sementes mostrou-se viável para conservação de germoplasma de *T. roseoalba* e de *C. antisyphilitica*, apesar da indicação de perda de viabilidade por meio do teste de Tetrázólio. Não houve alteração do percentual e velocidade de germinação, percentual de plântulas normais e da sobrevivência das plantas ao final do processo de aclimatização. Além disso, a criopreservação elevou o número de folhas e a massa fresca de *C. antisyphilitica*, e não alterou a massa seca em ambas as espécies. Para *T. roseoalba*, a criopreservação reduziu o comprimento da parte aérea das plântulas, e reduziu o teor de amido e aminoácidos em plântulas de *T. roseoalba* e de *C. antisyphilitica*, respectivamente. Contudo, houve aumento do conteúdo de açúcares solúveis totais em plântulas de *C. antisyphilitica* provenientes de sementes criopreservadas. A criopreservação acarretou modificações significativas nas cores e geometria de sementes e plântulas, evidenciando que apesar de ser uma técnica viável para conservação de sementes destas espécies, pode interferir no desenvolvimento normal das plantas.

Palavras-chave: Conservação *in vitro*; Plantas Medicinais; Cerrado; Ipê-branco; Ipê-verde.

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente perda de recursos genéticos e a degradação dos ecossistemas naturais em todo o mundo, esforços contínuos devem ser feitos para que o máximo de material genético de relevância atual ou potencial seja conservado para as gerações futuras (WESLEY-SMITH et al., 2015). Neste sentido, a conservação *ex situ* é essencial para preservar a diversidade biológica, especialmente para espécies vegetais (PIJUT et al. 2012). Nos últimos anos, houve um grande avanço das pesquisas em criopreservação de recursos genéticos vegetais, resultando no

estabelecimento de protocolos para conservação de germoplasmas em bancos de genes *ex situ* de numerosas espécies (WALTERS et al., 2005; FREITAS et al., 2016; FARIA et al., 2017). Como exemplo, pode-se citar a criopreservação de sementes de *H. serratifolius* que obteve bons resultados por meio da técnica de vitrificação (SOUZA et al., 2015). Desta forma, na última década, as coletas de germoplasma passaram a incluir recursos genéticos de espécies silvestres, particularmente de plantas com potencial medicinal (WALTER et al., 2005).

Pertencentes à família Bignoniaceae, *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (Ipê-branco) e *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Martius (Ipê-verde) são árvores nativas do Cerrado, muito requisitadas para paisagismo, arborização urbana, recomposição vegetal de áreas degradadas, e comumente exploradas por suas propriedades medicinais (LORENZI, 2008). Como plantas medicinais, há relatos na literatura sobre a utilização de *T. roseoalba* como anti-inflamatório pela medicina popular, e estudos da aplicação do extrato etanólico de suas folhas para redução do ácido úrico do sangue (FERRAZ-FILHA et al., 2016). Para *C. antisyphilitica*, foi comprovado a eficácia do lapachol, extraído de sua casca, como inibidor do desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti*, principal transmissor do vírus da dengue, febre Chikungunya e vírus Zika (RODRIGUES et al., 2005), além de atividade anticancerígena (GARKAVTSEV et al., 2011). Além disso, suas folhas servem ainda para tratamento de dor de cabeça, infecções urinárias, blenorragia e sífilis (PINTO et al., 2013). Neste sentido, a crescente demanda mundial por medicamentos fitoterápicos tem despertado a atenção de muitos pesquisadores para plantas que possuam este potencial de aplicação e a relevância de sua conservação (MATTOS e SALIS, 2005; YUNES e CALISTO, 2011; PINTO et al., 2013).

No Brasil, a exploração predatória das plantas medicinais, e a falta de programas de conservação de germoplasma dessas espécies têm gerado redução da biodiversidade. Aliado a isso, existe uma crescente demanda por mudas de espécies florestais nativas do Cerrado, que evidencia a necessidade de se estabelecer protocolos que permitam o armazenamento de sementes, e sua pronta disponibilização para atender às necessidades dos plantios (LELES et al., 2006). Juntamente com a exploração predatória de plantas que produzem compostos bioativos, o Cerrado, onde predomina a ocorrência destas espécies, é o segundo maior bioma brasileiro em extensão, considerado o mais ameaçado do país, e um dos 34 hotspots ambientais mundiais, atualmente considerado atualmente como área crítica para conservação (MYERS et al., 2000), o que justifica esforços para conservação do germoplasma destas espécies.

Em espécies florestais nativas do Cerrado é comum a ocorrência de sementes com baixa longevidade natural, o que dificulta seu armazenamento e utilização fora da época de produção (CARVALHO, SILVA, DAVIDE, 2006; SOUZA et al., 2015; SOUZA et al., 2017). Neste sentido, apesar de serem consideradas ortodoxas (GEMAQUE et al., 2005; SILVA et al., 2011), quando armazenadas, sementes do gênero *Tabebuia* perdem a viabilidade rapidamente, mantendo-se em média por cerca de quatro meses em condições ambientes (LORENZI, 2008; BORBA FILHO E PEREZ, 2009). Tais características podem comprometer o desenvolvimento de programas de reflorestamento embasados no fornecimento constante de mudas de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*. Para conservação de *T. roseoalba*, foi avaliada a viabilidade de sementes em função do tempo de armazenamento, verificando-se uma queda acentuada do percentual de germinação (G%), além do comprimento e do peso de matéria seca das plântulas a partir de 6 meses de armazenamento (ABBADE e TAKAKI, 2014). Para *C. antisiphilitica*, apesar de não ter havido variação no G% (entre 83% e 90%) em relação ao tempo de armazenamento a vácuo, o percentual de emergência e de formação de plântulas normais foi reduzido a taxas de 4,3% e 3,02%, respectivamente, por mês (FREITAS et al., 2012).

Diante do exposto, diferentes técnicas da cultura de tecidos podem ser empregadas para conservação da variabilidade genética de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, de modo que a criopreservação de sementes destaca-se como uma técnica de conservação *ex situ* em longo prazo (SOUZA et al., 2015). Esta técnica consiste em conservar o material biológico vivo em temperaturas ultrabaixas (-196 °C) garantindo a viabilidade e estabilidade genética após o descongelamento, pois não permite a ocorrência de reações metabólicas dirigidas termicamente (PRITCHARD, 2007; ENGELMANN, 2011). Além disso, os bancos de germoplasma convencionais requerem grandes espaços físicos, manutenção constante e estão sujeitos à contaminações e pragas ocasionando perdas significativas (PRITCHARD e NADARAJAN, 2008; ENGELMANN, 2011). O armazenamento de germoplasma em bancos criogênicos também é considerado uma alternativa viável, pois requer um investimento financeiro menor ao longo do tempo em comparação com outros sistemas de conservação de material genético disponíveis (DULLOO et al., 2009). Diferentes protocolos de criopreservação já foram estabelecidos com sucesso para inúmeras espécies nativas do Cerrado (SALOMÃO, 2002; SOUZA et al., 2015; PRUDENTE et al., 2015; PINTO et al., 2015), contudo, há poucas informações a respeito da criopreservação de sementes de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*.

A conservação de sementes apresenta-se como a forma mais fácil, comum e eficiente de conservação *ex situ* garantindo a variabilidade genética natural das espécies (PENÇE, 2010; GOLDFARB et al., 2011). Desta forma, considerando a ampla utilização e potencial medicinal destas espécies, bem como a necessidade de conservação da biodiversidade de espécies florestais nativas do Cerrado, objetivou-se estabelecer um protocolo de criopreservação para sementes de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica*, como alternativa de conservação *ex situ* de germoplasma por um longo período de tempo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e beneficiamento de sementes

Sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridley) Sandwith e *Cybistax antisiphilitica* (Martius) Martius foram fornecidas pelo Viveiro de Mudanças Nordesta LTDA, Arcos – MG. As sementes foram coletadas na região sul de Minas Gerais, entre os meses de outubro e dezembro de 2015, e armazenadas em sacos de papel a ± 4 °C até serem enviadas para o laboratório. Para beneficiamento e homogeneização das sementes, foi efetuada a remoção manual das alas, e efetuada a verificação de possíveis anormalidades morfológicas. Em seguida, todas as sementes foram lavadas com detergente e água corrente durante 20 minutos e deixadas para secar em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Uma amostra das sementes foi selecionada aleatoriamente, e utilizada para determinação do grau de umidade (GU%) pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas, de acordo com a Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2013), sendo quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes para cada espécie.

2.2 Criopreservação e inoculação das sementes

Após o beneficiamento, foram selecionadas 400 sementes aleatoriamente de cada espécie, de forma que 200 sementes foram colocadas em criotubos (2,5 mL) e criopreservadas (+LN), enquanto as outras 200 sementes, não criopreservadas (-LN), foram mantidas em temperatura ambiente e utilizadas como controle. Após 1 hora de imersão em nitrogênio líquido (NL), as sementes foram descongeladas em banho-maria a 38 °C por 3 minutos, com subsequente

desinfestação e inoculação (FARIA et al., 2017). Foram selecionadas 200 sementes (100 para +LN e 100 para -LN) de cada espécie para proceder o teste de Tetrazólio. O procedimento de desinfestação de todas as sementes (-NL e +NL) ocorreu simultaneamente, em câmara de fluxo laminar por meio de imersão das sementes em álcool 70% durante 1 minuto, e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo, por 10 minutos, conforme Souza et al. (2015). Após o procedimento de desinfestação, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura, sendo duas sementes por tubo.

Para estabelecimento *in vitro* das plantas foi utilizado meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar (Sigma®), e teve seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a 121 °C, sob 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo as sementes foram transferidos para sala de crescimento, e mantidos sob luz fluorescente branca, com densidade de fluxo de fótons de 67 μM m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

2.3 Teste de viabilidade

A viabilidade das sementes criopreservadas, foi verificada por meio da realização do teste de Tetrazólio. Para tal, foi utilizada solução de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) à concentração de 0,5%, preparados em tampão fosfato a 10 mM e pH 7,0, com 50 sementes de cada tratamento (+LN e -LN), divididas em 5 repetições de 10 sementes, em delineamento estatístico inteiramente casualizado. Todas as sementes (+LN e -LN) foram pré-umedecidas, em papel toalha molhado com água destilada durante 3 horas. Posteriormente, cada eppendorff contendo 10 sementes recebeu 1 mL de solução de Tetrazólio e, foram mantidos em câmara de germinação tipo B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio), ajustada para 30 °C por 15 horas, e em ausência de luz. Em seguida, as sementes foram fotografadas, com subsequente centrifugação a 4.000 rpm durante 2 minutos, descartando o sobrenadante. Para extração do composto Formazan, cada eppendorff recebeu 1 mL de etanol 94% (v/v), os quais foram mantidos sob agitação por 5 minutos, em banho-maria à 80 °C. Após a extração, o material foi centrifugado a 4.000 rpm durante 2 minutos, sendo o sobrenadante reservado para as leituras de absorbância a 487 nm de comprimento de onda, em espectrofotômetro Beckman DU®. Para curva padrão, foi obtida cinco leituras de

absorbância do Formazan para cada ponto, sendo a viabilidade celular expressa como absorbância/g de peso fresco, de acordo com Benson (1994).

2.4 Germinação e crescimento inicial

Durante os primeiros 30 dias de cultivo após inoculação, avaliou-se: o percentual de germinação (G%) contabilizando-se o número de sementes com protusão radicular de ± 2 mm; o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo McGuire (1962); o percentual de ocorrência de plantas normais (PN%) (considerou-se como normais plantas com parte aérea e raízes bem desenvolvidas), o número de folhas total por planta (NF), e o peso de massa fresca (MF) e massa seca (MS) das plântulas, em delineamento estatístico inteiramente casualizado. A MF foi determinada por meio de pesagem das plântulas (-NL e +NL) em balança analítica de precisão. Após a pesagem, o material passou por secagem em estufa com circulação forçada de ar à 70 °C, até peso constante. Após esse período, o material foi retirado da estufa e colocado em dessecador com sílica gel durante 30 minutos para resfriamento, sendo, então, novamente pesado para determinação da MS. Uma parte da MS (15 plântulas inteiras de cada tratamento) foi separada, e macerada para proceder as análises bioquímicas. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* avaliou-se o comprimento da parte aérea das plantas (CPA) com auxílio de um paquímetro digital.

2.5 Aclimatização e sobrevivência de plantas recuperadas

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, procedeu-se a aclimatização de 25 plantas normais de cada tratamento (+LN e -LN), para ambas espécies, em delineamento estatístico inteiramente casualizado. As plantas foram transferidas para tubetes (250 cm³) contendo substrato comercial, os quais foram envoltos com embalagem plástica transparente para a manutenção da umidade relativa, e tiveram suas pontas cortadas em intervalos de 7 dias, até sua completa remoção aos 21 dias. Os tubetes contendo as plântulas foram mantidos em casa de vegetação sob sombrite 30%. Decorridos 30 dias do início da aclimatização, avaliou-se o percentual de sobrevivência das plantas.

2.6 Análises bioquímicas

Os efeitos da criopreservação sobre os teores de amido, açúcares solúveis totais e aminoácidos foram determinados sobre a massa seca de 15 plântulas inteiras de cada tratamento (+LN e -LN), em delineamento estatístico inteiramente casualizado. Estas plântulas foram secas em estufa de circulação forçada de ar à 70 °C até peso constante. A extração dos açúcares solúveis totais e aminoácidos foi realizada por meio da homogeneização de 200 mg de massa seca em 1200 µL de metanol, 500 µL de clorofórmio e 300 µL de água destilada, permanecendo em descanso em eppendorff durante 24 horas. Após o tempo de descanso, centrifugou-se a 2000 rpm durante 30 minutos, coletando-se o sobrenadante. Para extração do amido, o sólido precipitado foi tratado com 1 mL de ácido perclórico 30%, e deixado em descanso por mais 24 horas. Em seguida, centrifugou-se a 1300 rpm durante 30 minutos e coletou-se o sobrenadante (UMBREIT, BURRIS, STAUFFER, 1964). Para quantificação do amido e açúcares solúveis totais foi utilizado o método da Antrona, por espectrofotometria a 620 nm (YEMM E WILLIS, 1954). O teor de aminoácidos foi quantificado por reação de ninhidrina 5% e cianeto de potássio 2%, ambos em etileno glicol monoetil éter, etanol 60% e tampão citrato de sódio 0,2M e pH 5, por espectrofotometria a 570 nm (YEMM E COCKING, 1955). Os resultados foram expressos em µg.mg⁻¹ de matéria seca para os açúcares solúveis totais e amido, e µmol.mg⁻¹ de matéria seca para aminoácidos.

2.7 Avaliação biométrica

Para análise biométrica foram coletadas 10 sementes e 10 plântulas (com 30 dias de cultivo *in vitro*) de cada tratamento (+LN e -LN), para ambas espécies. A captura de imagens foi efetuada com câmera de alta resolução contida no equipamento GroundEye[®] L800 (PINTO et al. 2015), avaliando-se alterações de cor e geometria, em delineamento estatístico inteiramente casualizado. O modelo de cores utilizado no equipamento foi o CIELab (L*, a*, b*) que ordena e descreve todas as cores de acordo com sistema triangular: coordenada de luminosidade (L*) e duas coordenadas de cor a* para vermelho/verde e b* para amarelo/azul (HOFFMANN, 2018), além do método de Otsu, baseado na busca de um valor limite que minimiza a variância intraclasse de dois grupos de pixels em uma imagem.

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), por meio do *software* estatístico R Core Team (2011), versão 3.4.0, via pacote ExpDes.pt. As variáveis que não atenderam às pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade dos resíduos, sofreram transformação por meio da raiz quadrada.

3 RESULTADOS

Para facilitar a exposição e análise dos resultados, os dados foram agrupados, porém sem o objetivo de comparação entre as duas espécies. Desta forma, o grau de umidade (GU%) encontrado em sementes de *T. roseoalba* foi de 6,6% e 6,5% para o tratamento controle (-LN) e criopreservadas (+LN), respectivamente, enquanto que em sementes de *C. antisiphilitica* foi de 4,5% e 4,4% para o controle e criopreservadas, respectivamente (Tabela 9). Além disso, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o percentual de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG) e formação de plantas normais (PN%) de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica* criopreservadas em comparação com o controle (Tabela 9).

Tabela 9 - Grau de umidade (GU%), Germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN%) de *T. roseoalba* (Ipê-branco) e *C. antisiphilitica* (Ipê-verde) aos 15 dias de cultivo *in vitro*, submetidas à criopreservação (+NL) e mantidas em temperatura ambiente (-NL). Número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca (MF) e massa seca (MS) por planta aos 30 dias de cultivo *in vitro*, e o percentual de sobrevivência (S) ao final do processo de aclimatização.

	GU%	G%	IVG	PN%	NF	CPA (cm)	MF (g)	MS (g)	S (%)
<i>T. roseoalba</i> (-LN)	6,6 a	92,0 a	2,60 a	85,0 a	5,0 a	8,44 a	0,581 a	0,068 a	72,0 a
<i>T. roseoalba</i> (+LN)	6,5 a	93,0 a	2,50 a	80,0 a	4,6 a	7,00 b	0,487 a	0,056 a	78,0 a
<i>C. antisiphilitica</i> (-LN)	4,5 a	80,0 a	0,24 a	70,0 a	4,0 b	4,22 a	0,266 b	0,038 a	76,0 a
<i>C. antisiphilitica</i> (+LN)	4,4 a	90,0 a	0,33 a	75,0 a	5,1 a	4,30 a	0,374 a	0,052 a	79,0 a

* Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para *T. roseoalba* a criopreservação de sementes reduziu significativamente ($p < 0,05$) apenas o comprimento da parte aérea (CPA) de 8,44 cm no controle, para 7,0 cm (Tabela 9). Já para *C. antisiphilitica* a criopreservação de sementes elevou significativamente ($p < 0,05$) o NF e

a MF das plantas em relação ao controle. Entretanto, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a massa seca, e o percentual de sobrevivência de ambas espécies ao final do processo de aclimatização (Tabela 9).

Em relação a viabilidade das sementes criopreservadas, para *T. roseoalba* a criopreservação (+NL) elevou significativamente ($p < 0,05$) a absorbância de Formazan, o que pode estar associado a uma maior viabilidade. Por outro lado, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade de sementes de *C. antisiphilitica*, uma vez avaliada as médias de suas absorbâncias (Figura 24A). Desta forma, sementes de *T. roseoalba* apresentaram coloração vermelha intensa após a criopreservação, enquanto as sementes de *C. antisiphilitica* tiveram coloração mais clara, de acordo com o teste de Tetrazólio (Figura 24B e 24C).

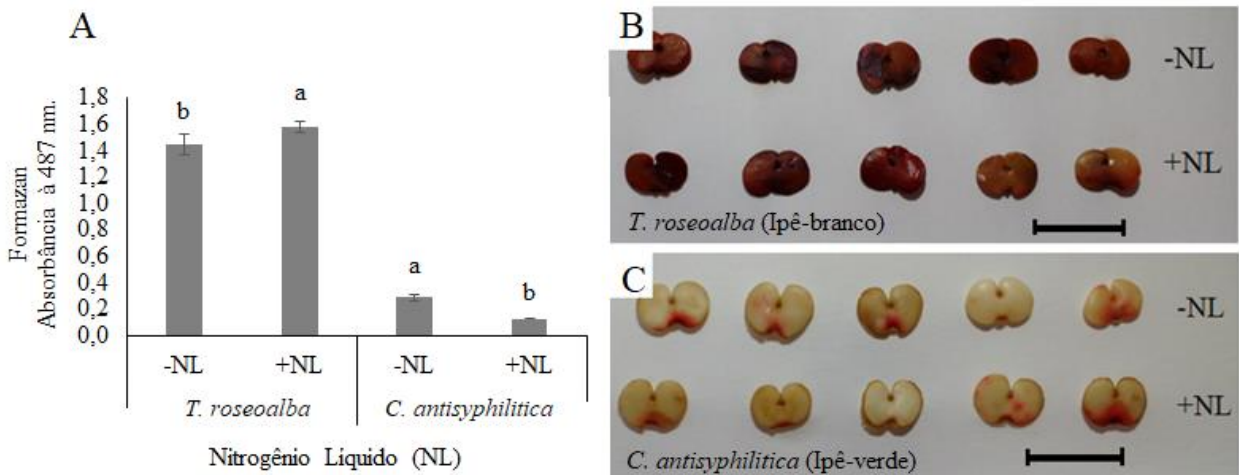


Figura 24 - Viabilidade de sementes de *T. roseoalba* (Ipê-branco) e *C. antisiphilitica* (Ipê-verde) expostas à criopreservação, de acordo com Teste de Trazólio (A). Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média. Sementes de *T. roseoalba* (B) e sementes de *C. antisiphilitica* (C), submetidas à criopreservação (+NL) e mantidas em temperatura ambiente (-NL). Barras: 1 cm.

A criopreservação de sementes reduziu significativamente ($p < 0,05$) o teor de amido nas plântulas de *T. roseoalba* (Figura 25A), contudo, não alterou o conteúdo de aminoácidos e teor de açúcares solúveis totais (AST) nas plantas desta espécie (Figura 25B e 25C). Já para plantas de *C. antisiphilitica* não houve alteração no teor de amido entre o tratamento controle e a criopreservação (Figura 25A). Por outro lado, nesta espécie, a criopreservação das sementes

reduziu significativamente ($p < 0,05$) o conteúdo de aminoácidos das plantas e elevou o teor de AST em relação controle (Figura 25B e 25C).

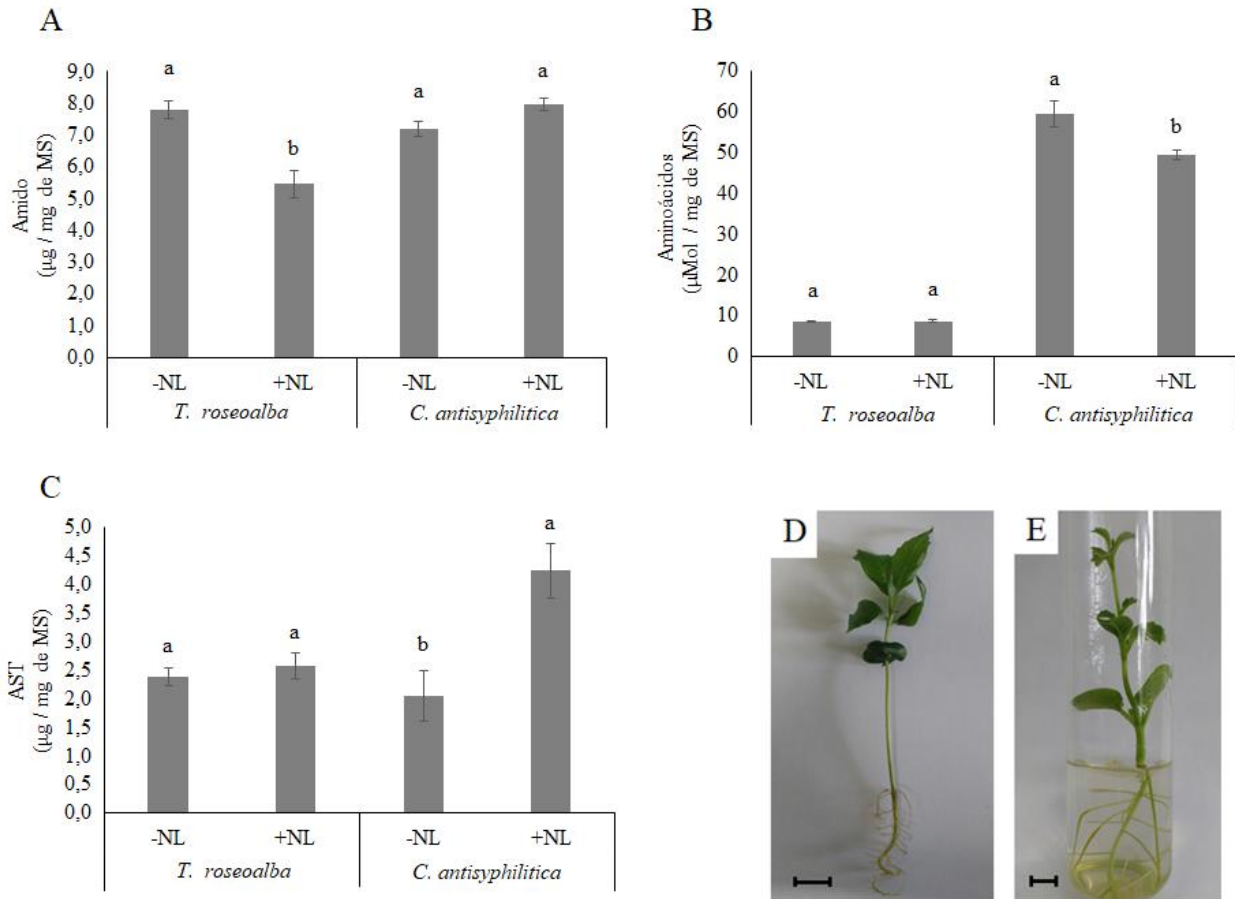


Figura 25 - Conteúdo de amido (A), aminoácidos (B) e açúcares solúveis totais (C) em plantas inteiras de *T. roseoalba* (D) e *C. antisiphilitica* (E), provenientes de sementes criopreservadas (+NL) e mantidas em temperatura ambiente (-NL). Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras dos gráficos: erro padrão da média. Barras da foto: 1 cm.

De acordo com a avaliação biométrica de cor e geometria, a criopreservação de sementes ocasionou modificações significativas ($p < 0,05$) tanto em sementes como em plantas de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica* (Figura 26).

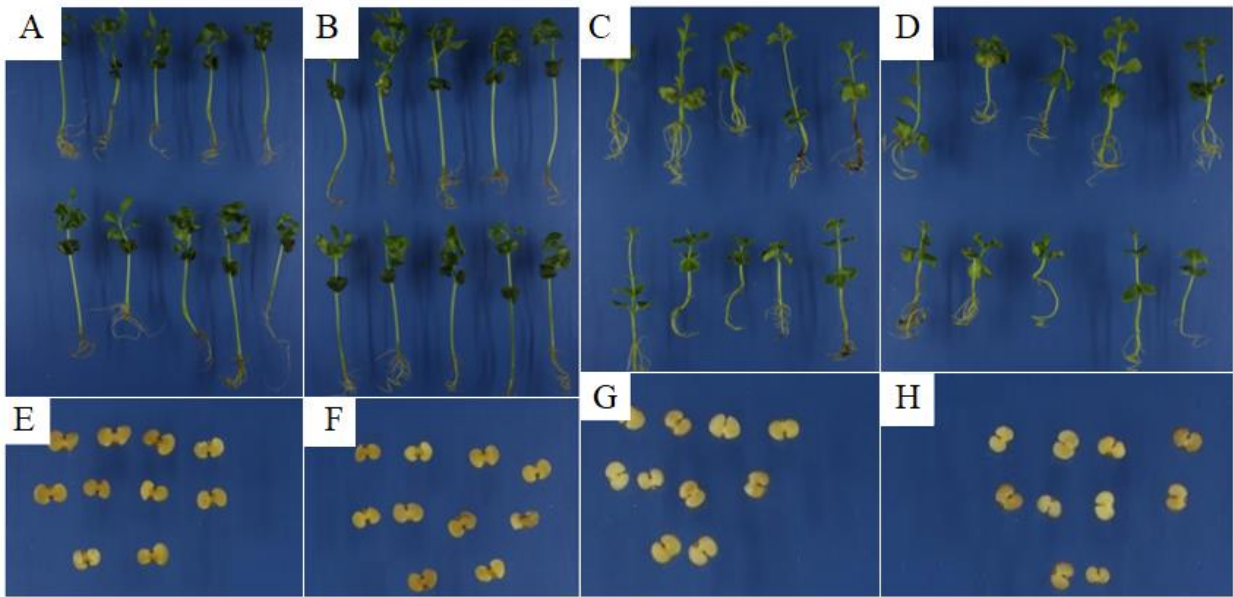


Figura 26 - Plantas de *T. roseoalba* provenientes de sementes criopreservadas (A) e tratamento controle (B), plantas de *C. antisiphilitica* provenientes de sementes criopreservadas (C) e tratamento controle (D). Sementes de *T. roseoalba* criopreservadas (E) e controle (F), sementes de *C. antisiphilitica* criopreservadas (G) e controle (H). A captura de imagens foi efetuada com câmera de alta resolução contida no equipamento GroundEye® L800.

A criopreservação (+NL) elevou de forma significativa ($p < 0,05$) a dominância cinza escuro de sementes de ambas as espécies, em relação ao controle (-NL). Por outro lado, para geometria de sementes, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a área e o perímetro em ambas as espécies (Tabela 10). Já para biometria de plantas, a criopreservação das sementes elevou significativamente ($p < 0,05$) a cor em CIELab: Dispersão, CIELab: Dispersão de a e CIELab: Dispersão de b para ambas as espécies, em relação ao controle. Além disso, para geometria das plantas, a análise biométrica mostrou redução significativa ($p < 0,05$) de área e perímetro em relação ao controle, apenas para plantas de *T. roseoalba* (Tabela 10).

Tabela 10 - Alterações biométricas relacionadas à cor e geometria de sementes e plantas de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica* submetidas à criopreservação (+NL) e mantidas em temperatura ambiente (-NL).

Biometria: Sementes	<i>T. roseoalba</i>		<i>C. antisiphilitica</i>		CV (%)
	-NL	+NL	-NL	+NL	
Cor: Dominância cinza escuro	0,02 b	0,03 a	0,03 b	0,04 a	17,23
Geometria: Área	0,56 a	0,53 b	0,37 a	0,33 b	12,04
Geometria: Perímetro	3,33 a	3,19 b	2,48 a	2,31 b	5,98
Biometria: Plantas					
Cor: CIELab: Dispersão	18,30 b	19,62 a	18,61 b	19,47 a	7,23
Cor: CIELab: Dispersão de a	5,350 b	5,84 a	5,05 b	5,65 a	13,03
Cor: CIELab: Dispersão de b	11,56 b	12,34 a	12,46 b	13,37 a	9,01
Geometria: Área	8,89 a	6,95 b	4,85 a	5,31 a	24,42
Geometria: Perímetro	68,62 a	56,78 b	35,40 a	41,00 a	18,71

* Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O grau de umidade elevado está entre os principais problemas que dificultam o armazenamento de sementes em bancos de germoplasmas, e em pesquisas de criopreservação (WALTERS et al., 2013). No presente estudo, as sementes de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica* apresentaram grau de umidade (GU%) de 6,6% e 4,5%, respectivamente (Tabela 9). Esta umidade relativamente baixa é característica de sementes de espécies ortodoxas, as quais podem ser armazenadas sem perda de viabilidade e vigor (FONSECA, FREIRE, 2003; HAY & PROBERT, 2013). Contudo, segundo Freitas et al. (2012), sementes de *C. antisiphilitica* dispersam-se com aproximadamente 10% de teor de água, levando até 26 dias para germinarem em ambiente natural. Desta forma, não foi necessário efetuar nenhum tipo de tratamento para dessecação das sementes, ainda que seja uma prática comum em estudos de criopreservação, a modulação do conteúdo de água dos tecidos antes do congelamento para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula (LOPES et al., 2013).

Sementes de *T. impetiginosa* (ipê-roxo) previamente desidratadas a um GU% de 4,2%, puderam ser criopreservadas por, pelo menos 360 dias, sem redução na sua qualidade fisiológica (MARTINS et al., 2009). Contudo, sementes de *H. heptaphyllus* (Ipê-rosa) com GU% acima de 4% apresentaram decréscimo significativo nos testes de germinação quando criopreservadas (TRESENA et al. 2009). Neste sentido, a modulação do GU% evita a formação de cristais de

gelo que causam danos físicos às células como, por exemplo, na ruptura do sistema de membranas celulares, perda da permeabilidade seletiva das mesmas e, afeta assim, a compartimentalização das organelas celulares (PANIS e LAMBARDI, 2006; WEN et al., 2012).

Para que uma semente complete a germinação, é necessário que alcance o teor de água suficiente para ativação metabólica, com consequente expansão radicular (ATAÍDE et al., 2016). Desta forma, além de interferir no processo de criopreservação, o GU% pode influenciar diretamente no processo germinativo e na viabilidade do lote de sementes. No presente estudo, não houve diferença para o percentual de germinação (G%) de sementes de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica* criopreservadas, em relação ao controle (Tabela 9). A germinação é um dos mais importantes estádios do biociclo vegetal, e inicia-se com a embebição, o que possibilita a retomada de crescimento do eixo embrionário e provoca o enfraquecimento e ruptura do endosperma, finalizando com a protusão radicular através do tegumento (SOUZA e SEGATO, 2016). É provável que o baixo conteúdo de água no interior das sementes tenha evitado a formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, minimizou os danos à ultra-estrutura celular, o que permitiu sua pronta germinação após o descongelamento. Contudo, apesar de bons resultados para a germinação, a criopreservação influenciou de maneira contrária a viabilidade das sementes de ambas espécies pelo teste de Tetrazólio (Figura 24A).

A viabilidade de sementes é um fator importante para validar a eficiência de um protocolo de criopreservação para espécies vegetais (MARTINS et al., 2009; SOUZA et al., 2015). O teste de Tetrazólio permite verificar a viabilidade das sementes ou de outras estruturas vegetais, rapidamente, com base na alteração da cor dos tecidos vivos, promovida pela ação da solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (OLIVEIRA et al., 2014). De acordo com Abbade e Takaki, (2014) o teste de Tetrazólio na concentração de 0,5% a 36 °C durante 24 horas é indicado para avaliar a viabilidade das sementes de *T. roseoalba*. Desta forma, é possível inferir que a atividade respiratória dos tecidos caiu em função da redução das absorbâncias a 487 nm, as quais se referem a leitura espectrofotométrica do Formazan, que é um produto cromogênico artificial resultante da redução de sais tetrazólio por desidrogenases e redutases (ALVES et al., 2010). Estes resultados contrastantes obtidos neste estudo justificam a utilização de mais de uma metodologia para avaliação da viabilidade, e para validar a eficiência de um protocolo de criopreservação para sementes.

O congelamento de sementes pode provocar danos irreversíveis aos tecidos por meio da destruição das membranas decorrente da formação de cristais de gelo, os quais podem reduzir a germinação e ocasionar maior produção de plântulas anormais (PANIS e LAMBARDI, 2006; WEN et al., 2012; WESLEY-SMITH et al., 2015). Contudo, neste estudo a criopreservação não alterou o índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica* em relação ao controle (Tabela 9). Ao considerar o processo germinativo de uma semente, a velocidade, uniformidade e taxa de germinação, dependem de fatores extrínsecos e intrínsecos às mesmas. Normalmente, os fatores intrínsecos estão associados à presença de inibidores ou promotores da germinação, enquanto que os fatores extrínsecos estão relacionados às características ecofisiológicas de cada espécie (DEMOTES-MAINARD et al., 2016). Desta forma, é possível criopreservar sementes de *T. roseoalba* e de *C. antisiphilitica*, e conserva-las em bancos de germoplasma *in vitro* por longos períodos de tempo, sem causar prejuízos à germinação, e sem a necessidade de efetuar um tratamento de dessecação nas mesmas.

A criopreservação de sementes também não alterou o percentual de formação de plantas normais (PN%) em relação ao controle para ambas espécies (Tabela 9). Estes resultados apontam para o sucesso desta metodologia de conservação de sementes em comparação com seu armazenamento a vácuo, especialmente para sementes de *C. antisiphilitica*, as quais tiveram o PN% reduzido em 3,02% ao mês (FREITAS et al., 2012). Além disso, a criopreservação elevou significativamente o NF em plantas de *C. antisiphilitica* em relação ao controle, o que não foi verificado em plantas de *T. roseoalba* (Tabela 9). Este resultado está de acordo com Guilherme et al. (2011), os quais afirmam que estímulos ambientais como variações de temperatura desencadeiam alterações fenológicas em plantas de *C. antisiphilitica* como produção de novas folhas, flores e frutos. Entretanto, este sistema de avaliação baseado no número de folhas correlacionado à criopreservação, ainda requer otimizações para esta espécie, uma vez que não houve diferença significativa para o comprimento da parte aérea (CPA) em relação ao controle (Tabela 9).

Em estudos de criopreservação de sementes é comum avaliar características morfológicas de plantas recuperadas, como por exemplo, em *H. serratifolius* que apresentaram grande variação no CPA, e redução na MF e MS das plantas (SOUZA et al., 2015). Já para *T. impetiginosa* não houve alteração do CPA de plantas provenientes de sementes criopreservadas (MARTINS et al., 2009). Este resultado está de acordo com os resultados de CPA de plantas de *C. antisiphilitica*

obtidos neste estudo, onde também não foi verificado alteração de CPA (Tabela 9). Por outro lado, para *T. roseoalba*, a criopreservação de sementes reduziu significativamente o CPA das plantas (Tabela 9). Estes resultados corroboram com Meletti et al. (2011) que também observaram redução significativa CPA de plantas de maracujazeiro (*Passiflora edulis*), provenientes da criopreservação de sementes, em comparação com o controle. Isto significa que embora a criopreservação seja aplicável para conservação de germoplasma de diversas espécies vegetais, sua utilização pode provocar alterações morfológicas significativas nas plantas. Contudo, apesar da redução do CPA observada em plantas de *T. roseoalba* descritas neste estudo, não houve diferença significativa para massa fresca (MF) e massa seca (MS) desta espécie quando submetidas à criopreservação. Já para plantas de *C. antisiphilitica* a criopreservação das sementes resultou em aumento significativo da MF (Tabela 9).

A taxa de sobrevivência das plantas ao final do processo de aclimatização foi maior que 70% para ambas as espécies, indicando para o sucesso da técnica de criopreservação para sementes de *T. roseoalba* e de *C. antisiphilitica* (Tabela 9). Após a germinação das sementes criopreservadas, a aclimatização das plantas é uma etapa crucial para verificação da eficiência desta técnica, pois um dos objetivos da criopreservação, além da conservação, é a possibilidade de restabelecimento do material no campo (SOUZA et al., 2015). Desta forma, apesar das plantas estarem susceptíveis a diversas fontes de estresse durante o transplante (SHINOHARA e LESKOVAR, 2014), estes foram tolerados pelas plantas de *T. roseoalba* e de *C. antisiphilitica* provenientes de sementes criopreservadas.

Na criopreservação de materiais biológicos, todos os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantidos em estado latente, o que permite uma preservação por longos períodos de tempo (WALTERS et al., 2013; CARMONA-MARTÍN et al., 2018). Contudo, após a germinação das sementes criopreservadas, e subsequente retomada do crescimento, foi possível verificar alterações bioquímicas em plantas de *T. roseoalba* e de *C. antisiphilitica*, indicando a ocorrência e percepção de estresse (Figura 25). Tanto a síntese como a degradação do amido são alteradas sob condições de estresse, com respostas especialmente associadas ao aumento nos níveis de açúcares solúveis e inibição da síntese de amido (ZHU et al., 2006). Desta forma, ainda que o presente protocolo de criopreservação possa ser utilizado para conservação de sementes de *T. roseoalba* e de *C. antisiphilitica*, a redução do conteúdo de amido

em plantas de *T. roseoalba* (Figura 25A), e elevação do conteúdo de açúcares solúveis totais em *C. antisiphilitica* (Figura 25C) indicam a ocorrência de estresse.

Outra alteração bioquímica importante relacionada a criopreservação de sementes de *C. antisiphilitica* neste estudo, foi a redução no conteúdo de aminoácidos (Figura 25B). Este resultado indica a existência de um mecanismo de alívio de estresse nesta espécie, visto que as plantas tendem a acumular prolina e outros aminoácidos livres em células e tecidos como mecanismo de adaptação e tolerância a diferentes condições de estresse (YAMADA et al., 2005; KUSAKA; OHTA; FUJIMURA, 2005; CORREIA et al., 2012). Desta forma, as células vegetais alteram a expressão gênica e reorganizam vias metabólicas e processos fisiológicos para se adaptar as novas condições (RODE et al., 2012). Este mecanismo de tolerância ao estresse pode ter influenciado na redução do conteúdo de aminoácidos livres, e/ou pode estar correlacionado com as respostas morfológicas como a elevação no número de folhas e na massa fresca de plantas de *C. antisiphilitica* verificadas neste estudo (Tabela 9).

A qualidade fisiológica das sementes e plantas pode ser avaliada a partir da análise de imagens realizada pelo equipamento GroundEye® L800 (PINTO et al. (2015)). Seu uso para a automação da análise de sementes pode facilitar as decisões sobre o destino ou disposição do lote, e é possível aplicar essas informações aos lotes de sementes criopreservadas, bem como mensurar alterações em plântulas decorrentes da exposição de sementes ao nitrogênio líquido. O uso de análise automatizada de imagens de sementes e plantas está associado à necessidade de métodos rápidos e precisos para avaliar sua viabilidade e a extensão dos danos decorrentes do armazenamento (DELL'AQUILA, 2009; KIKUTI, 2012).

As alterações de cor decorrentes da criopreservação de sementes de *T. roseoalba* e *C. antisiphilitica* puderam ser detectadas pelo equipamento GroundEye® L800 na análise biométrica, por limiarização, que é uma das ferramentas que leva à segmentação de imagens, e se caracteriza por reconhecer e distinguir uma imagem de seu fundo (GONZALEZ et al., 2010). O escurecimento da semente, por exemplo, pode ser uma indicação de que houve oxidação do tegumento (BEWLEY et al., 2013). Neste contexto, a observação de diferenças de cor, juntamente com o conhecimento de outras características de sementes, permite a determinação da presença, localização e natureza do dano (COSTA et al., 2003), e pode ser adaptado para a pesquisa de criopreservação (Tabela 10). Portanto, este equipamento apresenta técnicas que permitem avaliar a deterioração do armazenamento por meio da análise de cor (YAGUSHI et al.,

2014). Contudo, este tipo de avaliação automatizada na coloração das sementes, necessita ainda de maiores estudos de sua correlação com possíveis danos ocasionados pela criopreservação.

Além das mudanças de cor, alterações morfológicas como a geometria das sementes têm sido utilizadas na sua classificação por meio de imagens digitais e, neste estudo, puderam ser verificados pelo GroundEye® L800 (FELIPE e TRAINA, 2003). Embora não haja consenso sobre a definição de textura, esta pode ser referida como um conjunto de certos padrões existentes em superfícies físicas, perceptíveis ao olho humano e que trazem grande quantidade de informações sobre a natureza da superfície, como suavidade, rugosidade e regularidade (ALVES et al., 2010). Neste contexto, pode-se inferir que as diferenças geométricas detectadas pelo GroundEye® L800 estão relacionadas a modificações de superfície em sementes de *T. roseoalba* e *C. antisyphilitica*, devido ao tratamento de criopreservação. No entanto, mais estudos se fazem necessários para relacionar os parâmetros fisiológicos da avaliação da viabilidade de sementes e plantas com os dados biométricos fornecidos pelo equipamento GroundEye® L800.

5 CONCLUSÕES

A criopreservação de sementes mostrou-se viável para conservação de germoplasma de *T. roseoalba* e de *C. antisyphilitica*, sem necessidade de crioprotetores ou de tratamentos para dessecação de sementes.

A criopreservação de sementes reduziu o teor de amido e aminoácidos em plântulas de *T. roseoalba* e de *C. antisyphilitica*, respectivamente. Contudo, acarretou aumento do conteúdo de açúcares solúveis totais em plântulas de *C. antisyphilitica*.

Por fim, a criopreservação acarretou modificações significativas nas cores e geometrias de sementes e plântulas, as quais puderam ser observadas por meio de um mecanismo automatizado de avaliação.

6 REFERÊNCIAS

ABBADE, L. C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith-Bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. **Revista Árvore**, p. 233-240, 2014.

- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ATAÍDE, G. D. M.; BORGES, E. E. D. L.; FILHO, A. T. L. Alterações fisiológicas e biométricas em sementes de *Melanoxylon brauna* Schott durante a germinação em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, v. 40, n. 1, p. 61-70, 2016.
- BENSON, E. E. Cryopreservation. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. 2.ed. Oxford: IRL, 1994. Cap.7, p. 147-167.
- BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed. New York: Springer, 2013. 392p.
- BRASIL. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, v. de 17 de janeiro de 2013, p. 98, 2013.
- CARMONA-MARTÍN, E. et al. Cryopreservation of rhizome buds of *Asparagus officinalis* L.(cv. Morado de Huétor) and evaluation of their genetic stability. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 3, p. 395-403, 2018.
- CARVALHO, L. R.; DA SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.
- FARIA, C. V. N. et al. Criopreservação de sementes de *Physalis angulata* L. por meio da desidratação em sílica gel. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 2, p. 27-33, 2017.
- DEMOTES-MAINARD, S. et al. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 4-21, 2016.
- DULLOO, M. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, 2009.
- ENGELMANN, F. Cryopreservation of embryos: an overview. *Plant embryo culture: methods and protocols*, p. 155-184, 2011.
- FERRAZ-FILHA, Z. S. et al. *Tabebuia roseoalba*: *In Vivo* Hypouricemic and Anti-inflammatory Effects of Its Ethanolic Extract and Constituents. **Planta Medica**, v. 82, n. 16, p. 1395-1402, 2016.
- FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.
- GEMAQUE, R. C. R. et al. Efeito das secagens lenta e rápida em sementes de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, v. 11, n. 4, p. 329-335, 2005.

- GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 27-33, 2011.
- GUILHERME, F. A. G. et al. Fenologia de *Cybistax antisiphylitica* (Mart.) Mart. ex DC.(Bignoniaceae) na região urbana de Jataí, Goiás. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, 2011.
- HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2013.
- HOFFMANN, G. **CIELab Color Space**. Disponível em: <<http://docs-hoffmann.de/cielab03022003.pdf>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2018.
- LELES, P. S. S. et al. Qualidade de mudas de quatro espécies florestais produzidas em diferentes tubetes. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 69-78, 2006.
- LOPES, K. P. et al. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4ª edição. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, v. 1, p. 384, 2008.
- MCGUIRE, J. W.; CHIU, J. S. Y.; ELBING, A. O. Executive incomes, sales and profits. **The American Economic Review**, p. 753-761, 1962.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 83-91, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- OLIVEIRA, L. M. et al. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 468-474, 2014.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources., p. 61-78, 2006.
- PENCE, V. C. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. **Kew Bulletin**, v. 65, n. 4, p. 539-547, 2010.
- PINTO, C. A. G. et al. Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 319-328, 2015.

PINTO, M. D. S. Embriogênese somática direta e criopreservação de embriões de *Coffea arabica* L. cv. Catuí Vermelho. 2015.

PRITCHARD, H. W. Cryopreservation of desiccation-tolerant seeds. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, p. 185-201, 2007.

PRITCHARD, H. W.; NADARAJAN, J. **Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds**. In: (Ed.). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*: Springer, 2008. p.485-501.

PRUDENTE, D. D. O. et al. *In vitro* germination and cryopreservation of *Zinnia elegans* seeds. **Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 2, p. 243-250, 2015.

RODRIGUES, A. M. S. et al. Larvicidal activity of *Cydistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p. 755-757, 2005.

SALOMÃO, A. N. Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 133-138, 2002.

SHINOHARA, T.; LESKOVAR, D. Effects of ABA, antitranspirants, heat and drought stress on plant growth, physiology and water status of artichoke transplants. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 225-234, 2014.

SOUZA, A. C. et al. Cryopreservation and optimization of *in vitro* germination of *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1083, p. 481-483, 2015.

SOUZA, V. M. D. S.; SEGATO, S. V. Superação de dormência em sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Nucleus**, v. 13, n. 1, p. 71-80, 2016.

TEAM, R. D. C. **R Development Core Team: R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011.

TRESENA, N. L. et al. Qualidade fisiológica da semente de Ipê Rosa (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) submetidas à criopreservação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, p. 87-92, 2009.

WALTERS, C. et al. Preservation of recalcitrant seeds. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 915-916, 2013.

WEN, B. et al. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 323-335, 2012.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508, 1954.