



FERNANDA DA CONCEIÇÃO MOREIRA

**CULTIVO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE
SEMPRE VIVAS**

LAVRAS - MG

2015

FERNANDA DA CONCEIÇÃO MOREIRA

CULTIVO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE SEMPRE VIVAS

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

Orientador

Renato Paiva, PhD

Coorientadores

Dra. Fernanda Carlota Nery

Dr. Maurizio Lambardi

LAVRAS - MG

2015

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

Moreira, Fernanda da Conceição.

Cultivo e conservação *in vitro* de sempre vivas/ Fernanda da
Conceição Moreira. – Lavras : UFLA, 2015.

102 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Espécie endêmica. 2. Sistema de imersão temporária
(Plantform®). 3. Micropropagação. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

FERNANDA DA CONCEIÇÃO MOREIRA

CULTIVO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE SEMPRE VIVAS

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

APROVADA em 31 de Julho de 2015.

Dra. Fernanda Carlota Nery	UFLA
Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL
Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho	Embrapa Café
Dr. Leonardo Augusto Zebral Rodrigues	UFLA

Renato Paiva, PhD
Orientador

LAVRAS - MG

2015

Aos meus pais, Geraldo da Conceição Moreira e Maria José Moreira, pelo carinho, esforços, dedicação, apoio e incentivo, itens que me permitiram realizar essa conquista.

OFEREÇO

Ao meu irmão, Carlos Eduardo
Às minhas irmãs, Flávia e Hoziméria
Ao meu noivo Eglerson Duarte

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e iluminação durante toda esta jornada.

Aos meus pais, Geraldo da Conceição Moreira e Maria José Moreira, por todo o incentivo, apoio e amor dedicado durante toda a minha vida.

Ao meu irmão, Carlos Eduardo, por todo o carinho e amizade.

Às minhas irmãs Flávia e Hoziméria pela companhia, amor, carinho e incentivo.

Ao meu noivo Eglerson Duarte e família pelo seu amor, companheirismo, paciência e ajuda dedicada nos últimos 10 anos.

Ao Professor Renato Paiva, PhD., pela orientação, ensinamentos, confiança, por acreditar nos meus sonhos, ajudando-me de todas as formas possíveis a concretizá-lo e, principalmente, por defender-me em vários momentos e circunstâncias. "Prezado professor, o senhor tem o meu respeito e a minha admiração".

Ao Prof. Dr. Luciano Coutinho da Silva, pelo profissionalismo, pontualidade, carinho e paciência durante o desenvolvimento da tese.

Ao Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva pelo carinho, orientações e, principalmente, por todo suporte e apoio oferecido durante o estágio no exterior.

À equipe de pesquisadores do Consiglio Nazionale delle Ricerche – Instituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree (CNR-IVALSA), Sesto Fiorentino, Itália (Dr. Maurizio Lambardi, Dra. Carla Benelli, Dra. Anna Dicarlo e Aylin Elif Ozodogru) pelo acolhimento, ensinamentos e momentos compartilhados.

À Flávia Balieiro por toda a ajuda e companheirismo no exterior.

À Profa Dra. Fernanda Carlota Nery pelo apoio e orientações.

Aos professores que compõem o Programa de Fisiologia Vegetal pela formação acadêmica e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Mayara, Cecília, Cibele, Ana Luísa Soares, Ana Cristina de Souza, Marisa, Rodrigo, Thais, Débora, Camila e Michele.

À Lena pelo café e pelos momentos de conversa e conselhos.

Ao Joel e Odorêncio pela ajuda, amizade e pelos bons momentos de convivência.

À professora Dra. Maria Neudes de Oliveira pela orientação, durante seis anos em pesquisas com sempre vivas (Graduação e Mestrado) e, conseqüentemente, a experiência adquirida foi uma das bases importantes para a condução deste trabalho.

À Dra. Michele Valquiria dos Reis pelo apoio, orientações e pelos bons momentos compartilhados durante as pesquisas com sempre vivas desde a graduação em Diamantina.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

AUTOBIOGRAFIA

Fernanda da Conceição Moreira, filha de Maria José Moreira e Geraldo da Conceição Moreira, nasceu em 30 de abril de 1985, em Diamantina - MG. cursou o 1º grau na Escola Municipal Sagrada Família e o 2º grau na Escola Estadual Darcília Godoy, finalizando o Ensino Médio, em 2002. Em março de 2004, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, concluindo o curso em 2008. Em 2008, ingressou no Mestrado em Produção Vegetal pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, o qual concluiu em 2010. Em agosto de 2011, ingressou no Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Lavras-MG, onde realizou pesquisas na área de micropropagação e criopreservação com sempre vivas e com espécies nativas do Cerrado, sob a orientação do Prof. Renato Paiva, PhD. De junho de 2014 a maio de 2015, realizou pesquisas no Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree (CNR-IVALSA), Sesto Fiorentino, Itália, pelo programa Ciências sem Fronteiras (Doutorado sanduiche) na área de micropropagação e criopreservação. Concluiu o doutorado em 31 de julho de 2015.

RESUMO GERAL

Comanthera bisulcata (Eriocaulaceae) e *Xyris cipoensis* (Xyridaceae) são espécies ornamentais que ocorrem em ambientes de Campo Rupestre e encontram-se na lista de espécies ameaçadas de extinção. Objetivou-se realizar o (i) estabelecimento *in vitro*, o controle da senescência e a multiplicação de plântulas de *Comanthera bisulcata*. (ii) micropropagação e a (iii) conservação *in vitro* de *Xyris cipoensis*. Para o estabelecimento *in vitro* de *C. bisulcata* foi realizada a desinfestação de sementes em diferentes tempos de imersão ao NaOCl. A germinação e o crescimento de plântulas foram avaliados em meio WPM com diferentes pHs. Para o controle de senescência em plântulas foram testadas 0, 0,2, 2 e 20 μM de AgNO_3 e, para controle de oxidação em plântulas, foram estudadas 0 e 400 mg L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP). Para a multiplicação, testaram-se 2,68 μM de ANA, combinado com 2,27 μM de TDZ, 2,22 μM de BAP ou 2,32 μM de KIN. Posteriormente, foi realizado um experimento comparando o sistema semissólido e o sistema de imersão temporária líquida (Plantform®). Para *Xyris cipoensis* as sementes foram descontaminadas em diferentes tempos de exposição ao NaOCl. Para a germinação em meio WPM, testaram-se diferentes concentrações de sacarose. As sementes foram armazenadas em nitrogênio líquido. O descongelamento foi realizado em diferentes períodos. Sementes foram desidratadas em diferentes tempos, criopreservadas e descongeladas. Em *C. bisulcata*, verificou-se a maior porcentagem de desinfestação (96%) e de germinação (54%) de sementes em cinco minutos de imersão ao NaOCl. As plântulas cultivadas em pH 4,4 apresentaram maior comprimento médio de raízes (1 cm) e maior altura média (2,8 cm) de plântulas. Durante a fase de multiplicação, a senescência de plântulas pôde ser reduzida com 0,2 μM de AgNO_3 e a oxidação com 400 mg L^{-1} de PVP. Para indução de brotações, melhores resultados foram obtidos com 2,68 μM de ANA + 2,27 μM de TDZ. A taxa de crescimento relativo e peso médio de plântulas demonstraram superioridade do sistema de imersão líquida temporária (Plantform®) em relação ao sistema semissólido durante a micropropagação de *C. bisulcata*. Em *X. cipoensis*, a maior porcentagem de descontaminação (90%) e de germinação (84%) foi observada após cinco minutos de exposição ao NaOCl com 15 g L^{-1} de sacarose. Um protocolo para o estabelecimento *in vitro* foi obtido e uma maior viabilidade pós-descongelamento das sementes criopreservadas foi alcançada após o descongelamento por 60 segundos. A sobrevivência aumentou quando as sementes foram desidratadas antes da criopreservação.

Palavras-chave: Espécie endêmica. Sistema de imersão temporária (Plantform®). Micropropagação. Criopreservação. Campo Rupestre. Biorreator.

GENERAL ABSTRACT

Comanthera bisulcata (Eriocaulaceae) and *Xyris cipoensis* (Xyridaceae) are ornamental species, occurring in *campos rupestres* environments and are on the endangered list species. The aim of this study were: (i) *in vitro* establishment, control of senescence and the multiplication of *Comanthera bisulcata* seedlings. (ii) micropropagation and (iii) conservation *in vitro* of *Xyris cipoensis*. To establish *in vitro* *C. bisulcata* was performed seeds sterilization at different times immersed in NaOCl. The germination and growth of seedlings were evaluated in WPM medium with different pH. For the control of senescence were tested 0; 0,2; 2 and 20 μM of AgNO_3 and the oxidation control was tested from 0 to 400 mg L^{-1} of polyvinylpyrrolidone (PVP). The multiplication was tested 2,68 μM of NAA + 2,27 μM of TDZ, 2,22 μM of BAP or 2,32 μM of KIN. Subsequently, an experiment was conducted comparing the semi-solid system and the temporary immersion system (Plantform®). The *Xyris cipoensis* seeds were decontaminated in different exposure times NaOCl. The WPM medium with different sucrose concentrations was tested. The seeds were stored in liquid nitrogen. Thawing was performed at different times. Subsequently, the seeds were dried at different times, cryopreserved and thawed for 60 seconds. In *C. bisulcata* the highest percentage of disinfection (96%) and germination (54%) of the seeds was observed in five minutes immersion in NaOCl. Seedlings grown at pH 4,4 showed higher average root length (1 cm) and greater average height (2,8 cm) of seedlings. During the proliferation phase, the seedlings senescence can be reduced with 0,2 M of AgNO_3 and the oxidation with 400 mg L^{-1} antioxidant polyvinylpyrrolidone and 2,68 μM of 2,27 μM ANA + TDZ was suitable to induce shoots. The relative growth rate (RGR) and average values average weight of seedlings demonstrated the superiority of temporary immersion system liquid (Plantform®) comparing to the semi-solid system during micropropagation *C. bisulcata*. The highest percentage of decontamination and germination (90% and 84%) was observed after five minutes of exposure to NaOCl and using 15g L^{-1} sucrose, respectively. An efficient protocol for the *in vitro* propagation was obtained and increased post-thaw viability of cryopreserved seed was reached after thawing for 60 seconds. Survival seeds increased when seeds were dehydrated before cryopreservation process.

Keywords: Endemic species. Native species. Temporary immersion system (Plantform®). *In vitro* conservation. Cryopreservation. Biorreactor.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Eletromicrografia de varredura em semente de *Comanthera bisulcata*. Barra representa 100 μm . T (tegumento), O (opérculo) e Ex (região onde ocorre a emissão do eixo embrionário durante a germinação)45
- Figura 2 Percentagem de descontaminação (A) e taxa de germinação (B) de sementes de *Comanthera bisulcata* cultivadas *in vitro*, após diferentes períodos de exposição ao NaOCl. Barras ($\pm\text{SE}$) seguidas de mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com teste de Tukey47
- Figura 3 Altura média de plântulas (A) e Comprimento médio de raízes (B) em plântulas de *Comanthera bisulcata* cultivadas *in vitro* em diferentes pHs. Barras ($\pm\text{SE}$) seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com Tukey49
- Figura 4 Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Comanthera bisulcata* (cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO_3)). Barras ($\pm\text{SE}$) seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com teste de Tukey51
- Figura 5 Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Comanthera bisulcata*. Cultivadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de nitrato de prata (AgNO_3) e com duas concentrações (0 e 400 mg L^{-1}) de PVP52
- Figura 6 Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Comanthera bisulcata*. cultivadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de nitrato de prata (AgNO_3) 400 mg L^{-1} de PVP e diferentes fontes de citocininas KIN (cinetina), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) e na ausência de citocininas (CONT.)54
- Figura 7 Plântulas de *Comanthera bisulcata* cultivadas *in vitro* em várias fases de desenvolvimento. (A) 15, (B) 30, (C) 60 e (D) 90 dias após o subcultivo. Barras representam 1 cm55
- Figura 8 Porcentagem de plântulas com organogênese indireta de *Comanthera bisulcata* cultivadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de nitrato de prata (AgNO_3) 400 mg L^{-1} de PVP e diferentes fontes de citocininas KIN (cinetina), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) e na ausência de citocininas (cont.). Barras ($\pm\text{SE}$) seguidas da

	mesma letra não apresentam diferenças significativas de acordo com Tukey	56
Figura 9	Porcentagem de plântulas com brotações pertencentes à <i>Comanthera bisulcata</i> . Cultivadas em meio WPM suplementado com 0,2 µM de nitrato de prata (AgNO ₃) 400 mg L ⁻¹ de PVP e diferentes fontes de citocininas KIN (cinetina), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) e na ausência de citocininas (cont.). Barras (±SE) seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas de acordo com Tukey	57
Figura 10	Plântulas de <i>Comanthera bisulcata</i> cultivadas <i>in vitro</i> . (A) Sistema semissólido e (B) Sistema de imersão temporária líquida (Plantform®). Plântulas cultivadas no sistema semissólido no final do primeiro (C) e do segundo (E) subcultivo. Plântulas cultivadas no sistema de imersão temporária líquida no final do primeiro (D) e do segundo (F) subcultivo. Barras representam 1cm	59

CAPÍTULO 3

Figura 1	Percentagem de descontaminação (1A) e germinação (1B) de sementes de <i>Xyris cipoensis</i> após a exposição ao NaOCl por diferentes períodos. Barras (±SE) com as mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey	77
Figura 2	Germinação de <i>Xyris cipoensis in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose para o estabelecimento <i>in vitro</i> . Barras (±SE) com a mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey.....	78
Figura 3	Efeito de diferentes períodos de descongelamento na germinação de sementes criopreservadas de <i>Xyris cipoensis</i> . Barras (±SE) com a mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey.....	80
Figura 4	Sementes de <i>Xyris cipoensis</i> . Sementes não criopreservadas (A) e as sementes criopreservadas nos tempos de descongelamento 30 (B), 60 (C) e 120 (D) segundos. Barras representam 200 µm.	83

CAPÍTULO 4

- Figura 1 As análises de regressão para as relações entre a (%) de germinação e o tempo de desidratação para as sementes que não foram expostas (-LN) e que foram expostas (+LN) ao nitrogênio líquido. Cada ponto representa a média de 250 sementes. Os modelos de regressão foram usados e uma equação linear simples para os tratamentos + LN e uma equação quadrática para o tratamento -LN.....97
- Figura 2 Plântulas de *Xyris cipoensis* obtidas de sementes desidratadas durante 5 h que não foram expostas (-LN) (A) e que foram expostas (+LN) ao nitrogênio líquido (B). Os tubos foram inoculados com cinco sementes cada. As setas indicam plântulas germinadas e as pontas da seta indicam sementes que não germinaram.....99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Multiplicação de plântulas pertencentes à *Comanthera bisulcata*. Cultivadas em sistema semissólido e em sistema de imersão temporária (Plantform®), durante duas subculturas. TCR (taxa de crescimento relativo) = (g. g⁻¹ dia⁻¹).....58
- Tabela 2 Caracterização de plântulas pertencentes à *Comanthera bisulcata* cultivadas em sistema semissólido e o sistema de imersão temporária (Plantform®), no final da segunda subcultura. Letras diferentes em cada coluna indicam valores significantes diferentes a $p \leq 0.05$. PM (peso médio), AM (altura média), FL (folhas), RS (roseta), OI (organogênese indireta) e HP (Hiper-hidricidade)61

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução Geral	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Sempre vivas	18
2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	19
2.3 Biorreatores	22
2.4 Conservação <i>in vitro</i>	24
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2 Estabelecimento <i>in vitro</i> , controle de senescência e multiplicação de <i>Comanthera bisulcata</i> (körn.) L.R. Parra & Giul.....	34
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1 Material vegetal	38
2.2 Caracterização ultraestrutural de sementes	38
2.3 Germinação <i>in vitro</i>	39
2.4 Influência do pH na germinação <i>in vitro</i>	40
2.5 Controle de senescência	40
2.6 Controle da oxidação	41
2.7 Efeito de diferentes fontes de citocininas	42
2.8 Comparação entre sistema convencional de cultura e o sistema de imersão temporária (Plantform®)	42
2.9 Análises estatísticas.....	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.1 Caracterização ultraestrutural de sementes	45
3.2 Germinação <i>in vitro</i>	46
3.3 Influência do pH na germinação e no desenvolvimento <i>in vitro</i>	48
3.4 Controle de senescência	50
3.5 Controle da oxidação	52
3.6 Efeito de diferentes fontes de citocininas	53
3.7 Comparação entre sistema convencional de cultura e o sistema de imersão temporária (Plantform®)	58
4 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO 3 Estabelecimento e conservação <i>in vitro</i> de <i>Xyris cipoensis</i> Smith & Downs: espécie ameaçada de extinção e ornamental	68
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	72

2.1	Material vegetal	72
2.2	Estabelecimento <i>in vitro</i>	72
2.3	Grau de umidade das sementes	73
2.4	Congelamento, descongelamento e retomada do crescimento	73
2.5	Microscopia eletrônica de varredura	74
2.6	Análise estatística	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	76
3.2	Grau de umidade das sementes	79
3.3	Congelamento, descongelamento e retomada do crescimento	79
3.4	Microscopia eletrônica de varredura	82
4	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86
	CAPÍTULO 4 Desidratação e criopreservação de sementes de <i>Xyris cipoensis</i>	91
1	INTRODUÇÃO	93
2	MATERIAIS E MÉTODOS	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
	REFERÊNCIAS	100

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

As espécies que recebem a denominação genérica de sempre vivas pertencem às famílias Eriocaulaceae, Xyridaceae, Cyperaceae, Amaranthaceae e Rapataceae (GIULIETTI et al., 2012). A coleta e a comercialização de sempre vivas ocorrem na região de Diamantina, MG, desde 1931 (GIULIETTI et al., 1996). A partir desse período, o produto teve demandas crescentes nos mercados nacional e internacional, tornando-se uma atividade que, ainda, contribui para a subsistência da população local, particularmente, das comunidades tradicionais (OLIVEIRA et al., 2015).

No início dos anos 80, uma redução de populações de algumas espécies endêmicas, a diminuição da área de ocorrência de várias espécies e uma nítida fase de declínio do volume comercializado foram documentadas por Giulietti et al. (1988). Em 1997, várias espécies de sempre vivas, dentre essas *Syngonanthus bisulcatus* (atualmente, conhecida como *Comanthera bisulcata* (Körn.) L.R. Parra & Giul.) foram adicionadas à Lista Oficial de Espécies Ameaçadas do Estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 1997).

Dentre as principais causas da redução de populações de sempre vivas em ambientes de ocorrência natural, pode - se mencionar: a coleta de inflorescências na época que os capítulos apresentam as brácteas alvas e glabras. Porém, as sementes, ainda, não atingiram a completa maturação e dispersão. Outras causas da redução da população natural são o uso indiscriminado do fogo no estímulo à floração, a remoção de plantas no momento da coleta (MONTEIRO; PEREIRA; DEL GALDIO, 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Embora a exportação de sempre vivas relacionadas em lista de espécies ameaçadas de extinção esteja proibida (Portaria 84, IBAMA 2006), a mesma é

permitida quando as espécies forem reproduzidas artificialmente ou quando provenientes de manejo de ecossistemas naturais (Instrução Normativa n. 177 do IBAMA, de junho de 2008). No entanto, para o caso de manejo em ecossistemas naturais de ocorrência das sempre vivas, não existe legislação que normatize os procedimentos de coleta e conhecimento sobre formas de reproduzir as espécies em condições artificiais (MONTEIRO; PEREIRA; DEL GALDIO, 2012; OLIVEIRA; CRUZ; TANAKA, 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

A propagação e a conservação de sempre vivas que constam na lista de ameaçadas de extinção representam uma importante perspectiva de uso sustentável, sugerida por vários pesquisadores (GIULIETTI et al., 1988; GIULIETTI et al., 2012; SCATENA; VICH; PARRA, 2004). A cultura de tecidos tem sido apontada como uma alternativa para a propagação e a conservação de espécies nativas que se encontram em perigo de extinção e não se propagam facilmente por métodos convencionais (LIMA-BRITO et al., 2011). Aliada a essa técnica, a criopreservação é considerada a maneira mais promissora de preservação em longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais (LI et al., 2014).

Estudos sobre micropropagação de sempre vivas já foram realizados em *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R. Parra & Giul. *subsp. mucugensis* referida como *Syngonanthus mucugensis* Giul. *subsp. mucugensis* (LIMA-BRITO et al., 2011), em *C. elegans* e *C. elegantula* referidas como *S. elegans* e *S. elegantulus*, respectivamente (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013, 2014). No entanto, nenhum estudo sobre micropropagação, envolvendo *Comanthera bisulcata* e *Xyris cipoensis*, foi desenvolvido até o momento. Para *Xyris cipoensis* consta, apenas, um estudo sobre criopreservação de sementes (MOREIRA et al., 2014).

Objetivou-se, neste trabalho, realizar o cultivo *in vitro* de sempre vivas e estudar a eficiência de técnicas de criopreservação, visando à conservação *in vitro* de *Comanthera bisulcata* e *Xyris cipoensis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sempre vivas

A família Eriocaulaceae Mart. compreende, aproximadamente, 1.400 espécies, incluindo 10 gêneros (GIULIETTI et al., 2012). No Brasil, a família Eriocaulaceae compreende cerca de 600 espécies distribuídas em oito gêneros. O principal centro de diversidade da família é a Cadeia do Espinhaço, onde se concentra a maioria dos estudos taxonômicos. Entretanto, as áreas de restingas, também, possuem uma diversidade considerável de espécies de Eriocaulaceae. Estudos recentes mostraram a ocorrência de espécies da família Eriocaulaceae nas restingas do estado do Rio de Janeiro (SILVA; TROVO, 2014).

As espécies são, popularmente, conhecidas como sempre vivas, porque uma vez secas, mantêm a aparência de estruturas vivas, sendo, amplamente, utilizadas como plantas ornamentais. A maioria das espécies da família Eriocaulaceae, comercializadas como margaridinhas, pertencem ao gênero *Comanthera* LBSm. que foi restabelecido a partir de *Syngonanthus* Ruhland (PARRA et al., 2010).

Nas sempre vivas, pertencentes ao gênero *Comanthera* (Eriocaulaceae), o caule encontra-se reduzido a um rizoma subterrâneo de tamanho variável, podendo emitir brotações laterais, formando touceiras e, ainda, emitir rebentos, com folhas formando rosetas terminais. As plantas apresentam arquitetura em roseta e estrutura modular, as folhas localizam-se na base da roseta. Uma planta pode apresentar um módulo ou uma roseta, ou vários módulos (touceira). As inflorescências, na forma de capítulos radiados, possuem flores estaminadas e pistiladas distribuídas em camadas alternadas. A inflorescência, em forma de capítulo, está localizada no ápice do escapo (haste + inflorescência), com as

brácteas involucrais protegendo-a. As brácteas são responsáveis pelo valor ornamental e econômico das espécies do gênero (OLIVEIRA et al., 2015).

A família Xyridaceae (Poales) é predominantemente tropical e subtropical que abrange cinco gêneros e, aproximadamente, 415 espécies, popularmente, conhecidas como sempre vivas. As plantas pertencentes à família Xyridaceae são herbáceas, perenes e acaules, predominantemente, com flores amarelas, que ocorrem, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais alagadas e úmidas. Algumas dessas espécies podem crescer em condições ambientais específicas e restritas e sobreviver como populações pequenas e isoladas (CAMPBELL, 2012).

O gênero *Xyris* é amplamente distribuído nos campos rupestres (Campo Rupestre), sendo frequentemente encontrado na Serra do Espinhaço e em Montanhas Gerais da Serra do Goiás no Brasil (CAMPBELL, 2012). As espécies do gênero *Xyris* são, popularmente, classificadas como botões e, segundo atacadistas, a sua procura no mercado internacional tem crescido nos últimos anos.

2.2 Cultivo *in vitro*

A cultura de tecidos é uma técnica aplicada com diversas finalidades, sendo a micropropagação a de maior impacto, é a mais empregada. Técnicas de cultura de tecidos são indicadas para determinadas espécies, quando suas características botânicas impedem ou dificultam a propagação convencional, quando as mesmas encontram em lista de espécies ameaçadas de extinção, sendo usada, também, para a clonagem de plantas elite, propagação em larga escala e limpeza de vírus (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; MACHADO et al., 2011). É uma ferramenta importante, para o cultivo de células, tecidos e órgãos que

permite a propagação em larga escala de maneira asséptica e sob condições controladas (JANA; SHEKHAWAT, 2012).

Para a micropropagação, duas estratégias são comumente utilizadas: a regeneração de calos (organogênese indireta) e a multiplicação de brotos (organogênese direta). O estabelecimento de um protocolo de micropropagação, para uma determinada espécie, depende do controle de inúmeros fatores como: a fonte de explante, as condições fisiológicas da planta matriz, o genótipo, a composição do meio e as concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Os fitorreguladores se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*. As citocininas têm sido muito eficazes para promover a multiplicação em diversas espécies (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998). Entretanto, a utilização simultânea da auxina (ANA) e da citocinina (BAP) em meio MS não induziu a organogênese em *Comanthera mucugensis subsp. mucugensis* (LIMA-BRITO et al., 2011). Em *Comanthera elegantula* (referida como *Syngonanthus elegantulus*), a indução de novas brotações ocorreu com a utilização de 1,0 mg L⁻¹ de Thidiazuron (TDZ) ou 1,0 mg L⁻¹ de TDZ combinado com 0,5 mg L⁻¹ ácido naftalenoacético ANA (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013).

Uma das dificuldades da micropropagação de sempre vivas está relacionada com a rápida senescência *in vitro*. O ambiente fechado, na qual as plântulas ou explantes são cultivados, proporciona de modo geral o acúmulo de etileno, hormônio que pode desencadear vários processos, dentre esses a senescência foliar. Esse processo pode ser regulado pelo balanço entre o etileno e a citocinina nos tecidos (TAIZ; ZEIGER, 2010). Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de amenizar ou inibir a ação do etileno, bloqueando sua biossíntese ou a sua ação, por meio de inibidores de etileno. Dentre os inibidores da ação do etileno, podemos citar o nitrato de prata (AgNO₃) que age

inibindo a ação do etileno (COTESSA; VALENTINI; BOTTA, 2011; KERBAUY, 2008).

Outro problema observado, durante o cultivo *in vitro*, é a oxidação dos explantes. Para o controle da oxidação, diversos produtos podem ser adicionados ao meio de cultura, como cisteína, carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico ou ácido cítrico. Muitas dessas substâncias agem adsorvendo os exsudatos, liberados pelos explantes, os quais causam a oxidação (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Portanto, solucionar o problema da morte precoce dos explantes, causado pela oxidação ou senescência, é de suma importância para a continuidade do processo de micropropagação.

O enraizamento de brotações, ou seja, a formação de raízes adventícias é uma das etapas primordiais na propagação vegetativa, nessa etapa podem ocorrer perdas motivadas pela não formação de raízes ou pela formação de raízes pouco desenvolvidas (URIBE et al., 2012). Para o início da rizogênese, existe uma relação quantitativa entre os níveis de auxina e citocininas (FERREIRA et al., 2011). As auxinas são, geralmente, apontadas como a classe de fitorreguladores capazes de promover um acentuado aumento na formação de primórdios radiculares (URIBE et al., 2012). Entre as auxinas empregadas comumente podem ser citadas o AIA (ácido indol-acético), AIB (ácido indolbutírico) e ANA (ácido naftalenoacético) (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). O carvão ativado é considerado benéfico, durante o processo de enraizamento, pois reduz a quantidade da intensidade de luz na região de formação de raízes, porém, concentrações elevadas de carvão ativado podem até mesmo impedir o processo de enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Após o processo de enraizamento, a nova etapa que deve ser superada é a fase de aclimatização. Essa fase consiste na retirada da planta da condição *in vitro*, ou seja, a transferência para a casa-de-vegetação e, posteriormente, para o campo (MOREIRA et al., 2006). A aclimatização é uma etapa delicada, pois as

plantas oriundas do cultivo *in vitro* são sensíveis à desidratação e tenras. Isso se deve ao não desenvolvimento de uma cutícula espessa o que provoca uma alta taxa de evapotranspiração, além disso, as paredes celulares não apresentam a rigidez necessária para a sustentação da nova planta. As folhas de plantas cultivadas *in vitro* são delgadas e apresentam uma taxa fotossintética muito baixa, além de possuírem estômatos não funcionais. Essas características são fonte de estresse para a planta logo após o seu transplântio (COUTO; WAGNER JÚNIOR; QUEZADA, 2003).

A escolha do substrato é outro ponto que deve ser observado na aclimatização de plantas propagadas *in vitro*, pois influencia o seu crescimento e desenvolvimento, dessa forma sendo essencial para o sucesso da aclimatização (COUTO; WAGNER JÚNIOR; QUEZADA, 2003; PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013). O substrato confere o suporte da planta e tem influência sobre a qualidade das raízes formadas (HOFFMANN et al., 2001). A aclimatização da sempre viva *C. elegantula* (referida como *Syngonanthus elegantulus*) foi afetada pelo substrato e, também, pelo processo de pré-aclimatação. A melhor aclimatização ocorreu nas plantas aclimatizadas em areia onde 74% das plântulas sobreviveram. Menores sobrevivências, como 43% e 29% foram obtidas em plantas aclimatizadas em Plantimax TM[®] e vermiculita, respectivamente (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013).

2.3 Biorreatores

A técnica de cultura de tecidos convencional, usada para a propagação em massa de plantas, utiliza o meio de cultura semissólido. Os meios são solidificados por agentes de geleificação, o que pode aumentar o custo de produção das plantas micropropagadas e limitar a taxa de proliferação e a absorção de nutrientes (LAMBARDI et al., 2015).

O sistema de imersão temporária (TIS) baseia-se em limitar o contato dos explantes com o meio líquido por ciclos de imersão e alternando os períodos de seca, combina as vantagens de ambos os sistemas de cultura líquidos, meio semissólido e convencional (WELANDERA; PERSSONAJ; ZHU, 2014). Como principais vantagens desse sistema, podemos citar: o contato mais uniforme entre o meio de cultura e os rebentos em comparação com a cultura convencional em meio geleificado, a redução da asfixia e a hiper-hidricidade, a diluição de compostos tóxicos, a produção da oxidação e o escurecimento da cultura, a substituição periódica da atmosfera no interior do recipiente de cultura limita a acumulação de gás (principalmente, o CO₂ e o etileno) (BENELLI; MOREIRA; CARLO, 2015).

O Plantform®, um dispositivo de TIS, recentemente desenvolvido permite a imersão periódica de forma independente e a ventilação dos recipientes, a possibilidade de reduzir o trabalho com o custo de mão de obra. A alteração da frequência e da duração do tempo de imersão do meio, permite um melhor controle das plantas em morfogênese (LAMBARDI et al., 2015). Apresenta um maior espaço interior disponível para o desenvolvimento de plantas e um tamanho adequado para o manuseamento. Podem ser acomodados um sobre o outro, economizando espaço, característica interessante, quando o objetivo é a produção (WELANDERA; PERSSONAJ; ZHU, 2014).

Estudos, usando o sistema de imersão temporária (Plantform®), têm sido conduzidos em *Carex oshimensis*, *Chrysanthemum morifolium*, *Ficus carica*, *Ribes rubrum*, *Myrtus communis* e *Olea europaea* e os resultados obtidos confirmam a conveniência da TIS, baseada em Plantform®, para a proliferação de explantes de alta qualidade (BENELLI; MOREIRA; CARLO, 2015; LAMBARDI et al., 2015). Atualmente, não há relatos da micropropagação de sempre vivas utilizando o biorreator Plantform®.

2.4 Conservação *in vitro*

As sementes são a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que esta é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (PRITCHARD; NADARAJAN, 2008). As espécies de sempre vivas produzem sementes muito pequenas, variando de 0,4 a 0,8 mm de comprimento, 0,2 a 0,4 mm de largura e 1,4 a 9,5 mg de massa seca, elípticas e de coloração castanho avermelhada. As sementes apresentam fotodormência (fotoblásticas positivas) o que indica a existência de um padrão para as espécies dos gêneros *Comanthera* e *Syngonanthus* em relação ao tamanho e ao requerimento de luz para germinação (GARCIA, OLIVEIRA; DUARTE, 2014). São classificadas como ortodoxas e consideradas como sementes pequenas (OLIVEIRA; GARCIA, 2005).

Estudos sobre a longevidade de sementes de sempre vivas armazenadas no solo da Serra do Cipó-MG constataram que as sementes de *Syngonanthus verticilatus* e de *Syngonanthus caulescens*, enterradas *in natura* ou tratadas com fungicida, permaneceram viáveis no solo por todo o período avaliado (34 meses). As sementes de *S. anthemidiflorus* apresentaram redução significativa na germinabilidade, após o 12º mês de armazenamento, com nenhuma germinabilidade no 34º mês. As sementes de *Comanthera bisulcata*, *elegans* e *venusta* mostraram redução significativa da germinabilidade, ao longo de 26 meses (*Comanthera bisulcata*) e 22 meses de armazenamento (*Comanthera elegans* e *Comanthera venusta*), apresentando percentagens inferiores a 40% no final do experimento (GARCIA, OLIVEIRA; DUARTE, 2014).

Considerando a redução na taxa de germinação das espécies de sempre vivas com o tempo de armazenamento, em condições naturais, e a escassez de conhecimento sobre manejo, é urgente a necessidade de geração de conhecimento sobre formas alternativas de propagação e de conservação do

material genético dessas espécies. A elaboração de protocolos de conservação de sementes em nitrogênio líquido (criopreservação) poderia garantir a formação de um criobanco de sementes, garantindo, portanto, o armazenamento em longo prazo.

Dentre as técnicas de conservação *in vitro*, a criopreservação é considerada uma das mais promissoras. Esta técnica consiste na conservação do material biológico em nitrogênio líquido na sua forma líquida a -196°C ou vapor a -150°C . Essa ultrabaixa temperatura reduz, drasticamente, todas as reações metabólicas, garantindo a viabilidade do armazenamento por longos períodos em razão de a energia cinética molecular ser muito baixa e a difusão ser extremamente lenta (LI et al., 2014). Podem-se utilizar diferentes tipos de explantes para a conservação, dentre os quais se podem citar: protoplastos, suspensões celulares, calos embriogênicos, gemas apicais e laterais, sementes, embriões zigóticos e somáticos (ENGELMANN, 2000). Além disso, as culturas são armazenadas em pequenos espaços e estão protegidas de contaminação, requerendo uma pequena manutenção. Outro ponto relevante é o fato do custo do armazenamento em um banco criogênico ser mais barato que outros sistemas disponíveis (ENGELMANN, 2004).

O teor de água dos explantes no momento da imersão em nitrogênio líquido representa o fator mais crítico para o sucesso da criopreservação (PENCE, 1995; STANWOOD, 1985). A umidade deve ser reduzida em um nível tal que a formação de gelo intracelular, durante a etapa de congelamento, seja minimizada, com isso, mantendo elevados níveis de capacidade de retomada do crescimento (BLACK; PRITCHARD, 2002).

A prevenção da formação de cristais de gelo pode ser obtida pela vitrificação que permite uma rápida taxa de congelamento. A vitrificação é definida como uma transição direta da água no estado líquido para um estado amorfo ou vítreo, ou em outras palavras, é a solidificação de líquidos sem a

cristalização (ENGELMANN, 2011). Obtém-se o estado de vitrificação pelo congelamento rápido em nitrogênio líquido. Para tanto, é necessário que a solução celular esteja muito concentrada para evitar injúrias letais durante a imersão no nitrogênio líquido.

Esse processo é dependente do incremento da viscosidade que ocorre quando os solutos se tornam mais concentrados. A desidratação, uma forma de concentrar a solução celular, pode ser obtida em câmara de fluxo laminar ou em sílica gel, desidratação por congelamento, aplicação de substâncias crioprotetoras penetrantes ou não, ou ainda pela utilização das técnicas em conjunto (PANIS; SWENNEN, 2005; ENGELMANN, 2011). O aumento da viscosidade inibe a formação de cristais de gelo, porém o estado de vitrificação é instável, principalmente, durante o descongelamento. Nessa etapa pode haver formação de cristais de gelo quando este passa do estado de vitrificado para o estado líquido. Para evitar a recristalização, o material deve ser retirado do nitrogênio líquido e rapidamente descongelado (CHEN et al., 2011; BENSON, 2008; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

A criopreservação visando à conservação *ex situ* de sementes de sempre vivas foi aplicada apenas para sementes de *Xyris cipoensis* (MOREIRA et al., 2014) e não há relatos de estudos envolvendo as demais técnicas descritas acima. O desenvolvimento de protocolos de criopreservação pode contribuir para a preservação dos recursos genético dessas espécies, listadas como ameaçadas de extinção.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**: volume 1. Brasília: Embrapa, 1998. p. 183-260.
- BARRETO, L. C.; ECHTERNACHT, L.; GARCIA, Q. S. Seed coat sculpture in *Comanthera* (Eriocaulaceae) and its implications on taxonomy and phylogenetics. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 299, n. 1, p. 1461-1469, Apr. 2013.
- BENELLI, C.; MOREIRA, F. C.; CARLO, A. de. 'Plant Form', a temporary immersion system, for *in vitro* propagation of *Myrtus communis* and *Olea europaea*. In: INTERNATIONAL ISHS SYMPOSIUM ON PRODUCTION AND ESTABLISHMENT OF MICROPROPAGATED PLANTS, 6., 2015, Italy. **Proceedings...** Italy: ISHS, 2015. p. 19-24.
- BENSON, E. E. Criopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation**: a practical guide. Corvalis: Springer, 2008. p. 15-32.
- BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. Glossary. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants**: drying without dying. Oxon: CABI, 2002. p. 373-382.
- BRITO, S. L. et al. *In vitro* morfogênese de *Syngonanthus mucugensis* Giul. *subsp. mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 502-5010, maio/jun. 2011.
- CAMPBELL, L. M. Pólen morfologia de xyridaceae (poales) e seu potencial sistemática. botânico. **Revisão**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 428-439, jan. 2012.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 24 p.
- CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by dropletvitrification. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr. 2011.
- CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL. Lista das espécies ameaçadas de extinção da flora do estado de Minas Gerais. **Diário Executivo, Legislativo e Publicações de Terceiros**, Belo Horizonte, 30 out. 1997.

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na cadeia do espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1-2, p. 89–97, dez. 2008.

COTESSA, C.; VALENTINI, N.; BOTTA, R. Decreasing the concentration of IBA or combination with ethylene inhibitors improve bud retention in semi-hardwood cuttings of hazelnut cultivar ‘Tonda Gentile delle Langhe’. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 131, n. 22, p. 103-106, Nov. 2011.

COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeitos de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cesarifera* EHRH.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 125-128, abr./jun. 2003.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

ECHTERNACHT, L. et al. Areas of endemism in the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil. **Flora**, Rio de Janeiro, v. 206, n. 1, p. 782–791, fev. 2011.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.).

Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. Tsukuba: IPGRI, 2000. p. 8-20.

_____. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. In: WALTERS, C. et al. (Ed.). **Plant genetic resources newsletter**. Rome: IPGRI, 1997. p. 9-18.

_____. In vitro conservation of tropical plant germplasm: a review. **Euphytica**, Wageningen, v. 57, n. 36, p. 227-243, Oct. 1991.

_____. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cell & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 40, n. 4, p. 427-433, Feb. 2004a.

_____. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004b.

_____. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FERREIRA, J. P. et al. Enraizamento *in vitro* de clones de mamoeiro ‘Tainung 01’. **Ciência Agrônômica**, Jaboticabal, v. 42, n. 2, p. 563-566, abr./jun. 2011.

GALBRAITH, D. W. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GARCIA, Q. S.; OLIVEIRA, P. G.; DUARTE, D. M. Seasonal changes in germination and dormancy of buried seeds of endemic Brazilian Eriocaulaceae. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 113–117, June 2014.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. 500 p.

GIULIETTI, A. M. et al. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 1–19, 2012.

_____. Studies in “sempre-vivas” (everlasting plants): taxonomy focusing the species from Minas Gerais, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 329–377, dez. 1996.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 4, n. 1, p. 133-159, jul. 1991.

GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 179-193, dez. 1988.

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

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

HOFFMANN, A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira ‘marubakaido’. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 462-467, 2001.

INSTITUTO TERRA BRASILIS. **Projeto sempre viva**: perspectivas de seu uso sustentado. Belo Horizonte: ITB, 1999.

JANA, S.; SHEKHAWAT, G. S. *In vitro* regeneration of *Anethum graveolens*, antioxidative enzymes during organogenesis and RAPD analysis for clonal fidelity. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 56, n. 1, p. 9-14, Jan. 2012.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 472 p.

LAMBARDI, M. et al. Improvement of shoot proliferation by liquid culture in temporary Immersion. In: INTERNATIONAL ISHS SYMPOSIUM ON PRODUCTION AND ESTABLISHMENT OF MICROPROPAGATED PLANTS, 6., 2015, Italy. **Proceedings...** Italy: [s.n.], 2015.

LI, B.-Q. et al. Shoot regeneration and cryopreservation of shoot tips of apple (*Malus*) by encapsulation-dehydration. **In Vitro Cellular, Biology & Desenvolvimento – Planta**, Columbia, v. 50, n. 3, p. 357-368, May 2014.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul: subsp. mucugensis. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 502-510, maio/jun. 2011.

MACHADO, M. P. et al. Enraizamento de microestacas de *Lavandula angustifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 767-772, maio 2011.

MINAS GERAIS. Lista de espécies ameaçadas de extinção no estado de Minas Gerais. **Diário do Executivo, Legislativo e Publicações de Terceiros**, Belo Horizonte, 30 out. 1997. p. 10-12.

MONTEIRO, F. T.; PEREIRA, D. B.; DEL GALDIO, R. S. Flower-picking and the Parque Nacional das sempre-vivas: between ideologies and territorialities. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v. 24, n. 3, p. 419-434, set./dez. 2012.

MOREIRA, F. C. **Avaliação de sistemas de cultivo das sempre vivas *Comanthera elegans* (Bong.) L.R. Parra & Giul. e *C. bisulcata* (Körn) L.R. Parra & Giul.** 2010. 100 p. Dissertation (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

MOREIRA, F. C. et al. Dehydration and cryopreservation of *Xyris cipoensis* seeds. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1039, n. 1, p. 243-246, July 2014.

MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, set./out. 2006.

NUNES, S. C. P. et al. Influence of time of harvest, location of production, and storage on the physiological quality of seeds of star-flowers (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland—Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 33–39, set. 2008.

NUNES, U. R. et al. Effect of the crop time, irrigation and dry soil seeds permanence in the initial development of *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 64–70, fev. 2008.

NUNES, U. R. et al. Maturation time, dispersion, crop and physiological quality of star flowers (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland) seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1775–1780, nov./dez. 2008.

OLIVEIRA, M. N. S. et al. Harvest times of *comanthera elegans*, a worldwide traded brazilian species of everlasting flower: implications on seed production, germination, and on species management. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 39, p. 20–27, July 2015.

OLIVEIRA, M. N. S.; CRUZ, L. I.; TANAKA, M. K. Collection time and seed germination of commercialized *Comanthera* (Eriocaulaceae) from Serra do Ambrósio, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 19–27, mar. 2014.

OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *S. elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* Silveira (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, n. 3, p. 639-645, 2005.

OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S. Germination characteristics of *Syngonanthus* seeds (Eriocaulaceae) in campos rupestres vegetation in south-eastern Brazil. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 21, n. 1, p. 39–45, Mar. 2011.

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

PARRA, L. R. et al. Reestablishment and new circumscription of *Comanthera* (Eriocaulaceae). **Taxon**, Utrecht, v. 59, n. 4, p. 1135–1146, Aug. 2010.

PARRA, L. R. **Redelimitação e revisão de *Syngonanthus Sect. Eulepis* (Bong. Ex. Koern) Ruhland – Eriocaulaceae**. 2000. 201 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 37, n. 1, p. 32-39, jan./fev. 2013.

_____. Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans* Bong.) Ruhland: an ornamental species. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 347-353, jul./set. 2014.

PENCE, V. C. Cryopreservation of recalcitrant seeds. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer Verlag, 1995. p. 29-50. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 32).

PIRANI, A. M.; MENEZES, N. L. Estudos em sempre vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 179-193, Jan. 1988.

PRITCHARD, H. W.; NADARAJAN, J. Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 485–502.

RIVAL, A. et al. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed derived plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 12, p. 884-887, 1997.

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

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v. 12, n. 1, p. 70-94, jul. 2000.

SCATENA, V. L.; CARDOSO, V. A.; GIULIETTI, A. M. Morfoanatomia de espécies *Blastocaulon Ruhland* (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 13, n. 1, p. 29-41, 1999.

SCATENA, V. L.; VICH, D. V.; PARRA, L. R. Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* (Bong. ex Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 18, n. 4, p. 825-837, 2004.

SILVA, L. E. F. da; TROVÓ, M. A família Eriocaulaceae nas restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 4, p. 871-883, out./dez. 2014.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 199-226.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 690 p.

WELANDERA, M. et al. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 227-232, Sept. 2014.

**CAPÍTULO 2 Estabelecimento *in vitro*, controle de senescência e
multiplicação de *Comanthera bisulcata* (körn.) L.R.
Parra & Giul.**

RESUMO

Comanthera bisulcata (Eriocaulaceae) é uma espécie ornamental, que ocorre no ambiente de Campo Rupestre e encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção. Uma das alternativas, para a conservação de espécies ameaçadas, é a aplicação da técnica de cultura de tecidos. Objetivou-se, com o presente estudo, realizar o estabelecimento *in vitro*, o controle da senescência e a multiplicação de plântulas de *Comanthera bisulcata*. Para o estabelecimento *in vitro*, foi realizada a desinfestação de sementes em diferentes tempos (1, 5, 10, 15 e 20 minutos) de imersão ao NaOCl. A germinação e o crescimento de plântulas foram avaliados em meio WPM com diferentes pH (4,4; 5,0; 5,4 e 5,8). Para o controle de senescência, foram testadas 0, 0,2, 2 e 20 μM de AgNO_3 e para controle de oxidação foram testadas 0 e 400 mg L^{-1} de PVP. Para a multiplicação testaram-se 2,68 μM de ANA combinado com 2,27 μM de TDZ, 2,22 μM de BAP ou 2,32 μM de KIN. Posteriormente, foi realizado um experimento comparando o sistema semissólido e o sistema de imersão temporária líquida Plantform®. Os resultados demonstraram que a maior porcentagem de desinfestação (96%) e de germinação (54%) de sementes foi observada em cinco minutos de imersão ao NaOCl. As plântulas cultivadas em pH 4,4 apresentaram maior comprimento médio de raízes (1 cm) e maior altura média (2,8 cm) de plântulas. Durante a fase de multiplicação, a senescência de plântulas pode ser reduzida com 0,2 μM de AgNO_3 e a oxidação com 400 mg L^{-1} do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) e 2,68 μM de ANA + 2,27 μM de TDZ é adequado para induzi-la a brotações. A taxa de crescimento relativo e peso médio de plântulas demonstraram a superioridade do sistema de imersão líquida temporária (Plantform®) em relação ao sistema semissólido durante a micropropagação de *Comanthera bisulcata*.

Palavras-chave: Espécie nativa. Biorreator. Cultivo *in vitro*. Nitrato de prata. Campo Rupestre.

ABSTRACT

Comanthera bisulcata (Eriocaulaceae) is an ornamental species, occurring in *campos rupestres* environment and is on the list of endangered species. An alternative to the conservation of endangered species is the application of tissue culture technique. The aim of this study was to perform *in vitro* establishment, control of senescence and the multiplication of *Comanthera bisulcata* seedlings. To establish *in vitro*, the seed disinfection was performed at different times (1, 5, 10, 15 and 20 minutes) soaking in NaOCl. The germination and growth of seedlings were evaluated in WPM medium with different pH (4,4, 5,0, 5,4 and 5,8). For the control of senescence as 0, 0,2, 2, 20 μM AgNO_3 and oxidation control was tested 0 and 400 mg L^{-1} PVP. For multiplication was testing 2,68 μM of NAA + 2,27 μM of TDZ, 2,22 μM of BAP or 2,32 μM of KIN. Subsequently, an experiment was conducted comparing the semi-solid system and the temporary immersion system (Plantform®). The results demonstrated that the highest percentage of disinfestation (96%) and germination (54%) of the seeds was observed in five minutes immersion NaOCl. Seedlings grown at pH 4,4 showed higher average root length (1 cm) and greater average height (2,8 cm) of seedlings. During the proliferation phase, the seedlings senescence may be reduced with 0,2 mM of AgNO_3 and oxidation with 400 mg L^{-1} antioxidant polyvinylpyrrolidone (PVP) and 2,68 μM of 2,27 μM ANA + TDZ is suitable to induce shoots. The growth rate of average values and relative weight of seedlings demonstrated the superiority of temporary immersion system liquid (Plantform®) relative to the semi-solid system during micropropagation *Comanthera bisulcata*.

Keywords: Native species. Bioreactor. *in vitro* culture. Silver nitrate and *Campos rupestres*.

1 INTRODUÇÃO

Comanthera bisulcata (Körn.) L.R. Parra & Giul. é uma espécie ornamental, popularmente, denominada como sempre viva, pertencente à família Eriocaulaceae e ao gênero *Comanthera* L B Sm., que foi restabelecida a partir de *Syngonanthus* Ruhland (BARRETO; ECHTERNACHT; GARCIA, 2013). A família Eriocaulaceae Mart. compreende, aproximadamente, 1.400 espécies, incluindo 10 gêneros (GIULIETTI et al., 2012). No Brasil, o principal centro de diversidade da família é a Cadeia do Espinhaço, no Estado de Minas Gerais, onde se concentra a maioria das espécies alvo dos estudos taxonômicos e mais de 90% dessas espécies são endêmicas (GIULIETTI et al., 2005).

As espécies do gênero *Comanthera* são, popularmente, classificadas como margaridinhas e essas espécies na década de 80 representaram uma importante fonte de recursos econômico, em virtude da exportação dessas inflorescências, especialmente, para os mercados dos Estados Unidos e da Europa (GIULIETTI et al., 1987). Desde 1997, essa espécie encontra - se na Lista Oficial de Espécies Ameaçadas do Estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 1997). Dentre as principais causas da redução da população, em ambientes de ocorrência natural, pode - se mencionar a extração excessiva, indiscriminada e a falta de normativas que estabeleçam os procedimentos de coleta (MOREIRA, 2010).

Uma das alternativas para a conservação de espécies nativas que se encontram ameaçadas de extinção é a aplicação da técnica de cultura de tecidos. Essa técnica tem sido aplicada com sucesso para a propagação de *Comanthera mucugensis* subsp. *mucugensis* (LIMA-BRITO et al., 2011), *C. elegantula* e *C. elegans* (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013; PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2014). Na propagação *in vitro* de sempre vivas, um dos principais problemas é a

senescência precoce de plântulas. Esse processo é regulado pelo balanço entre o etileno e as citocininas nos tecidos (WOJTANIA et al., 2015).

O uso da técnica de cultura de tecidos convencional para a propagação em massa de plantas utilizando o meio de cultura semissólido, pode aumentar o custo de produção das plantas micropropagadas, limitar a taxa de proliferação e a absorção de nutrientes (LAMBARDI et al., 2015). O uso de biorreatores de sistema de imersão temporária líquida (TIS) permite a micropropagação em larga escala, a prevenção de distúrbios fisiológicos dos brotos e a hiper-hidricidade, a possibilidade de computadores serem usados no controle dos sistemas de biorreatores, apresentando, dessa forma, vantagens sobre a micropropagação convencional em termos de automação e da redução do trabalho (SILVA et al., 2007).

O Plantform®, um dispositivo de TIS, recentemente, desenvolvido, permite a imersão periódica de forma independente e a ventilação dos recipientes (WELANDER et al., 2014). Estudos recentes, usando o Plantform®, tem sido conduzido em *Carex oshimensis*, *Chrysanthemum morifolium*, *Ficus carica*, *Ribes rubrum*, *Myrtus communis* e *Olea europaea* (BENELLI; MOREIRA; CARLO, 2015; LAMBARDI et al., 2015) e os resultados obtidos confirmaram a superioridade da TIS, baseada em Plantform®, em relação ao sistema semissólido para a proliferação de explantes de alta qualidade. Porém, não há relatos de estudos desenvolvidos com o protótipo Plantform® para a micropropagação de *Comanthera bisulcata*.

Objetivou se, com o presente estudo, realizar a caracterização ultraestrutural de sementes, o estabelecimento *in vitro*, o controle da senescência e a multiplicação de plântulas de *Comanthera bisulcata* (Körn.) L.R. Parra & Giul.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As inflorescências da sempre viva *Comanthera bisulcata* (chapadeira) foram adquiridas no comércio local na cidade de Diamantina-MG. Posteriormente, as inflorescências foram processadas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal de Lavras. O processamento consistiu da retirada de sementes das inflorescências, de forma manual e da separação realizada com auxílio de uma peneira. As sementes foram armazenadas em geladeira (8°C), por dois meses, até a montagem dos experimentos.

2.2 Caracterização ultraestrutural de sementes

Os experimentos de microscopia eletrônica de varredura foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), localizado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

As sementes de sempre vivas foram fixadas em solução de Karnovsky (1965), modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2), sendo mantidas em geladeira, a 10 °C, por 72 horas. As amostras foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,05 M, durante 10 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas em água destilada e pós- fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) e desidratadas em série crescente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), durante 10 minutos, em cada solução e três vezes em acetona pura (100%). As amostras foram montadas em portas-amostras (stubs). A secagem foi realizada ao ponto crítico (Bal-Tec®)

tendo como meio de desidratação, o CO₂. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro (metalizador Bal-Tec[®]) e examinadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP (ALVES et al., 2004).

2.3 Germinação *in vitro*

Para a desinfestação em câmara de fluxo laminar, as amostras de 50 mg de sementes de sempre vivas foram colocadas em tubos plásticos estéreis de 25 mL com fundo cônico e adicionado 10 mL de etanol 70%. Após 30 segundos, com auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, o etanol foi removido e adicionado 10 mL de NaOCl (1% de cloro ativo). Após diferentes períodos (1, 5, 10, 15 e 20 minutos) de imersão, a solução de NaOCl foi removida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e, imediatamente, inoculadas em tubos de ensaio, contendo meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose (MOREIRA et al., 2014). Em cada tubo, foram inoculadas cinco sementes.

O meio foi solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e o pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e a um 1,2 de pressão por 20 minutos. Para cada período de imersão, foram utilizadas 50 repetições e cada repetição constituiu de um tubo contendo cinco sementes.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C. A porcentagem de sementes desinfestadas e a porcentagem de sementes germinadas foram avaliadas após 30 dias de cultivo.

2.4 Influência do pH na germinação *in vitro*

Para a desinfestação em câmara de fluxo laminar, as amostras de 50 mg de sementes de sempre vivas foram colocadas em tubos plásticos estéreis de 25 mL com fundo cônico e adicionado 10 mL de etanol 70%. Após 30 segundos, com auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, o etanol foi removido e adicionado 10 mL de NaOCl (1% de cloro ativo). Após cinco minutos de imersão, a solução de NaOCl foi removida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e, imediatamente, inoculadas em meio de cultura WPM suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose (MOREIRA et al., 2014) e o pH foi ajustado para diferentes valores (4,4; 5,0; 5,4 e 5,8) que foram os tratamentos testados. O pH 4,4 foi baseado em análises de solo de ocorrência natural de sempre vivas (MOREIRA, 2010). O meio de cultura foi solidificado com 7 g L^{-1} de ágar. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 30 dias da incubação, foi avaliada a porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento e, após 90 dias, foram avaliadas a altura média de plântulas, número de brotações, comprimento médio de raízes de plântulas desenvolvidas *in vitro* em diferentes condições de pH. Cada tratamento foi composto por 50 repetições, e cada repetição foi constituída por um tubo contendo cinco sementes.

2.5 Controle de senescência

Para o controle da senescência, as plântulas com três meses de idade, originadas de sementes germinadas *in vitro*, foram inoculadas em meio WPM suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose (MOREIRA et al., 2014) e diferentes concentrações (0, 0,2, 2 e $20 \mu\text{M}$) de AgNO_3 . O meio foi solidificado com

7 g L⁻¹ de ágar e o pH foi corrigido antes da autoclavagem a 121°C e a 1,2 atm de pressão, por 20 minutos. A solidificação do meio de cultura não ocorreu de forma adequada, quando foi adicionado AgNO₃ e o pH ajustado para 4,4. Para resolver esse problema foi usado pH 5,8.

Para cada tratamento, foram usadas 50 repetições e cada repetição constituiu de um tubo, contendo uma plântula.

Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Após 60 dias da incubação, foi avaliada a porcentagem de plântulas sobreviventes em cada tratamento.

2.6 Controle da oxidação

Para o controle da oxidação, as plântulas com três meses de idade, originadas de sementes germinadas *in vitro*, foram inoculadas em meio WPM suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose (MOREIRA et al., 2014), 0,2 μM de AgNO₃ e duas concentrações (0 e 400 mg L⁻¹) de PVP. O meio foi solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e o pH foi corrigido para 5,8 antes da autolavagem a 121°C e a 1,2 atm de pressão, por 20 minutos. Para cada tratamento, foram usadas 50 repetições e cada repetição constituiu de um tubo, contendo uma plântula.

Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Depois de 60 dias da incubação, foi avaliada a porcentagem de plântulas sobreviventes em cada tratamento.

2.7 Efeito de diferentes fontes de citocininas

Para a multiplicação, as plântulas com três meses de idade, estabelecidas *in vitro*, foram inoculadas em meio WPM suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose (MOREIRA et al., 2014), 0,2 µM de AgNO₃, 400 mg L⁻¹ de PVP e 2,68 µM de ácido naftaleno acético (ANA) combinado com 2,27 µM de thidiazuron (TDZ), 2,22 µM de benziladenina (BAP) e 2,32 µM de cinetina (KIN). Como controle, foi utilizado meio WPM suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, 0,2 µM de AgNO₃ e 400 mg L⁻¹ de PVP. O meio foi solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e o pH foi corrigido para 5,8 antes da autolavagem a 121°C e a 1,2 atm de pressão, por 20 minutos. Para cada tratamento, foram usadas 50 repetições e cada repetição constituiu de um tubo, contendo uma plântula.

Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹, foto período de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Após 60 dias da incubação, foi avaliada, em cada tratamento, a porcentagem de sobrevivência de calos e a porcentagem de brotações.

2.8 Comparação entre sistema convencional de cultura e o sistema de imersão temporária (Plantform[®])

Para realizar a comparação entre o sistema convencional de cultura e o sistema de imersão temporária, as plântulas com aproximadamente, um (um) cm de altura e com três meses de idade, foram transferidas para o sistema de imersão temporária líquido Plantform[®] (www.plantform.se) e para o sistema semissólido.

O biorreator Plantform[®] é fabricado em policarbonato transparente com tamanho de 180 x 160 x 150 mm. O interior do biorreator é constituído de uma cesta com orifícios de 1mm, sobre a cesta é disposto o material a ser

subcultivado. Uma moldura com quatro pernas é colocada por cima do cesto para evitar que ele suba quando ocorre a aplicação de ar no biorreator. A arquitetura do interior do cesto foi construída de forma estratégica, permitindo que o material vegetal entre em contato com o meio líquido, apenas durante o período, quando ocorre a injeção de ar (WELANDER et al., 2014).

A condição de imersão temporária testada foi 12 minutos/8 horas. O ar foi renovado por 15 minutos, a cada quatro horas. Como controle foram utilizadas plântulas cultivadas em frascos de vidro de 500 mL, contendo 100 mL de substrato semissólido, contendo 15 plântulas cada. No sistema semissólido, as plântulas foram subcultivadas no meio de cultura definido nos itens 2.5, 2.6 e 2.7. Para o sistema de imersão temporária, foi utilizado o mesmo meio utilizado no sistema semissólido com a ausência do ágar e 30 plântulas. No sistema semissólido foram utilizados dois frascos de vidro com 15 plântulas cada. Os subcultivos foram realizados, a cada 30 dias, totalizando dois subcultivos durante o período experimental.

No final de cada subcultivo, foi avaliada a taxa de crescimento relativo (TCR), sendo calculada pela seguinte equação: $TCR = (\ln M2 - \ln M1)/(t2 - t1)$, onde: M1 e M2 = massa fresca das plântulas referente aos tempos t1 e t2, respectivamente, e o ln = logaritmo neperiano. Após o segundo subcultivo, foram avaliadas: o número médio de folhas por planta, o diâmetro médio de roseta, a porcentagem de plântulas com organogênese (Número de plântulas com organogênese/Número total de plântulas cultivadas) * 100, o peso médio fresco de plântulas e a porcentagem de plantas com hiper-hidricidade (Número de plântulas com hiper-hidricidade/ Número total de plântulas cultivadas) * 100.

2.9 Análises estatísticas

Utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANOVA e as médias qualitativas comparadas pelo teste de Scott-Knott ou pelo teste de Tukey utilizando o $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização ultraestrutural de sementes

A caracterização das sementes de *Comanthera bisulcata* é importante, pois no presente estudo essas foram usadas como a primeira forma de propagação, na fase de estabelecimento *in vitro*. As sementes do gênero *Comanthera* apresentam características morfológicas específicas que permitem identificá-las ao nível de espécie. Dentre essas características para *C. bisulcata* pode - se mencionar o formato elíptico oval, o comprimento que pode variar de 0,30 a 0,50 mm, sendo consideradas sementes pequenas (Figura 1).

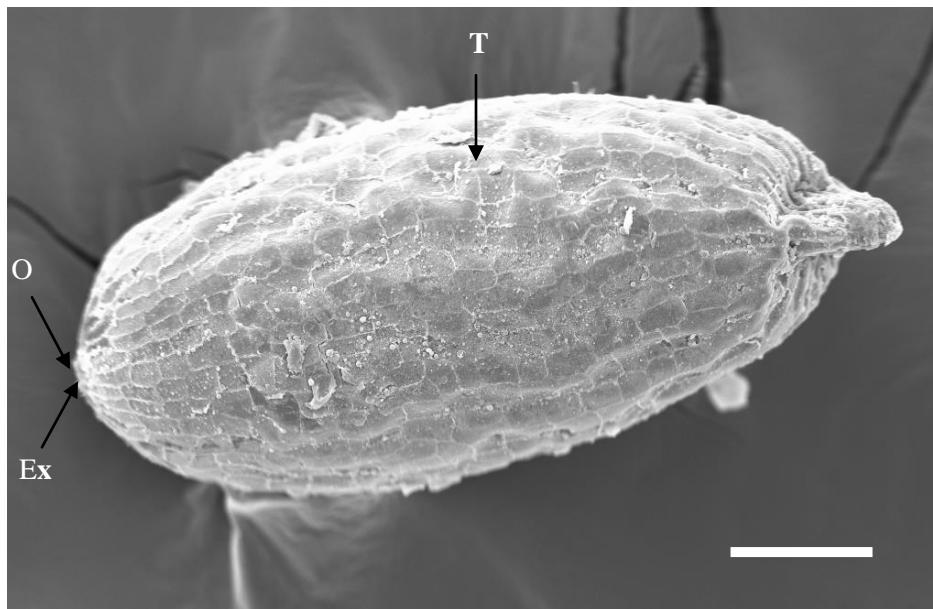


Figura 1 Eletromicrografia de varredura em semente de *Comanthera bisulcata*. Barra representa 100 μm . T (tegumento), O (opérculo) e Ex (região onde ocorre a emissão do eixo embrionário durante a germinação)

A escultura primária é rugosa ondulante, por projeções formadas, a partir da camada interna das saliências exteriores. Os revestimentos são únicos em cada espécie e para *Comanthera bisulcata* pode observar neste, estruturas côncavas e convexas (BARRETO; ECHTERNACHT; GARCIA, 2013). O revestimento da semente desenvolve conforme modificações de tegumentos em torno do óvulo. As modificações nas células do tegumento interno formam a micrópila, em que aumenta o número de células, por meio de divisões anticlinal e ocorre o acúmulo de substâncias fenólicas, originando o opérculo (COAN; ROSA; SCATENA, 2007). O desenvolvimento do eixo embrionário como a primeira estrutura que aparece, durante a germinação, foi descrita para *Comanthera elegans*. Com base nesse eixo, desenvolvem-se, primeiramente, as folhas e, posteriormente, as raízes adventícias (SCATENA; LEMOS-FILHO; LIMA, 1996).

3.2 Germinação *in vitro*

A porcentagem de descontaminação de sementes foi influenciada de forma significativa pelo período de exposição ao NaOCl ($p=0.0055$). As sementes expostas, durante cinco minutos ao NaOCl, apresentaram uma taxa de descontaminação de 96% (Figura 2A) e 54% de germinação (Figura 2B). Após cinco minutos de exposição ao NaOCl, uma redução na taxa de germinação de sementes foi observada ($p=0.0143$) (Figura 2B).

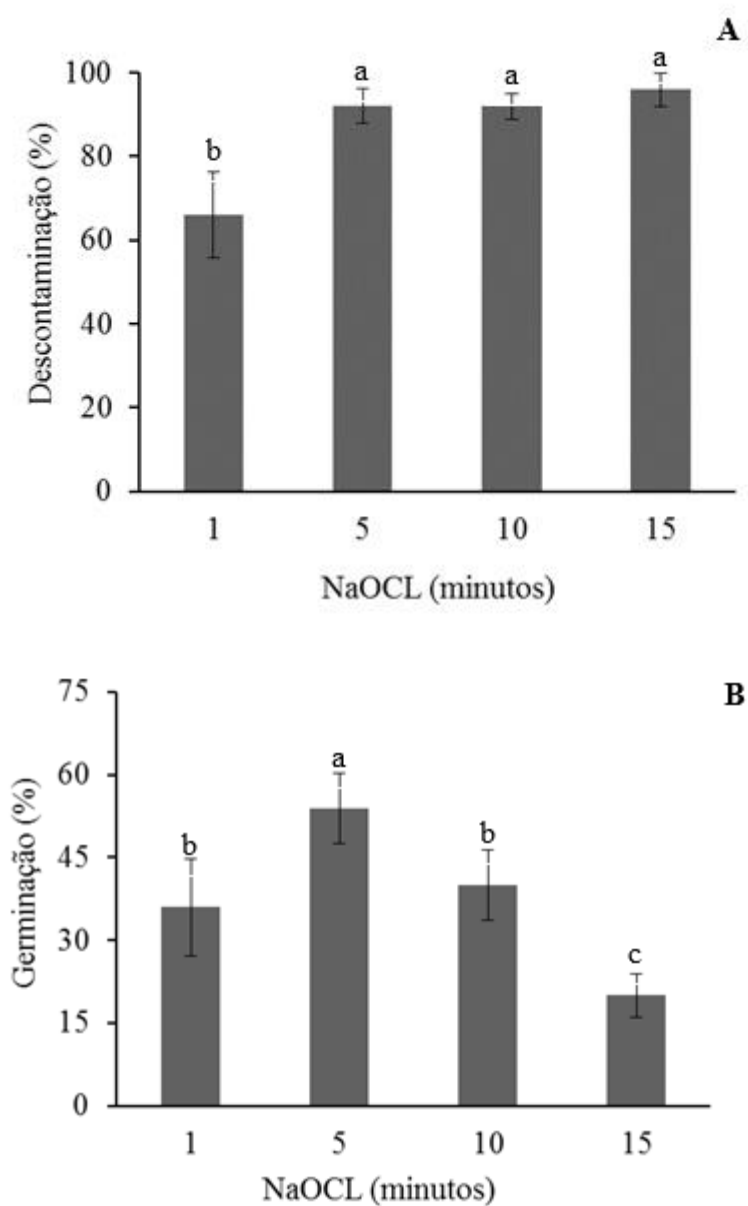


Figura 2 Percentagem de descontaminação (A) e taxa de germinação (B) de sementes de *Comanthera bisulcata* cultivadas *in vitro*, após diferentes períodos de exposição ao NaOCl. Barras (\pm SE) seguidas de mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com teste de Tukey

3.3 Influência do pH na germinação e no desenvolvimento *in vitro*

Verificou-se uma diferença significativa avaliando os diferentes pH. A diferença significativa foi observada para as variáveis altura média de plantas ($p=0.0026$) e para o comprimento médio de raízes ($p=0.000$) (Figuras 3 A e B).

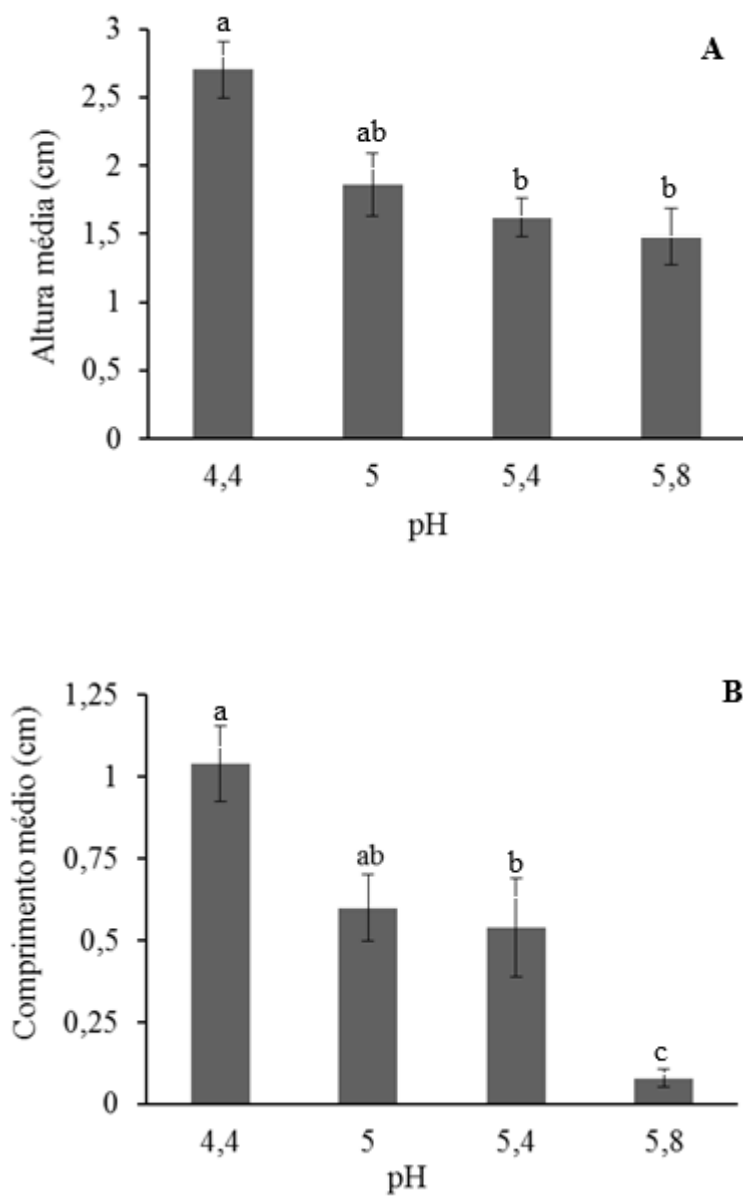


Figura 3 Altura média de plântulas (A) e Comprimento médio de raízes (B) em plântulas de *Comanthera bisulcata* cultivadas *in vitro* em diferentes pHs. Barras (\pm SE) seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com Tukey

Entretanto, o pH não influenciou de forma significativa a porcentagem de germinação de sementes ($p=0.0804$) e o número de brotações ($p=0.8595$). A germinação média foi de 70% e foram observadas, em média, 1,2 brotações/planta. As plântulas cultivadas em pH 4,4 demonstraram uma maior altura média (2,8 cm) quando comparadas às plantas cultivadas em pH 5,0, 5,4 e 5,8. Em meio mais ácido (pH 4,4), foram observadas, também, plântulas com maior comprimento médio de raízes (1 cm). Na medida em que o meio se tornou mais básico, observou-se uma redução no comprimento médio de raízes, possivelmente, esse efeito pode estar associado a uma maior disponibilidade de nutrientes nessa faixa de pH, resultando em uma menor alocação de biomassa para as raízes, destinadas a absorver nutrientes. As espécies de sempre vivas ocorrem em solos ácidos (NUNES et al., 2008), o que pode justificar plântulas com maior altura e com maior comprimento de raízes quando cultivadas em meio com pH 4,4 (Figura 3 A e B).

No cultivo *in vitro*, o pH é considerado um fator crítico do meio de cultura, podendo afetar a disponibilidade de nutrientes, de fitoreguladores de crescimento e no grau de solidificação do ágar, geralmente, esse é ajustado numa faixa que varia de 5,0 a 6,5 para o desenvolvimento adequado da maioria das espécies (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GRATAPLAGIA; MACHADO, 1998). Em diferentes pH (4,8, 5,8 e 6,8) testados, para mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), uma espécie arbórea nativa do Cerrado, a porcentagem de germinação de sementes foi semelhante, demonstrando a não significância dos tratamentos testados (SOARES et al., 2009).

3.4 Controle de senescência

Em *Comanthera bisulcata*, o processo de senescência é caracterizado pelo amarelecimento das estruturas vegetais, principalmente, as folhas,

resultando na mortalidade das plântulas. Essa iniciou uma semana, após o subcultivo. Para controlar a senescência de plântulas, foi adicionado ao meio de cultura, nitrato de prata (AgNO_3). Esse composto age como inibidor da ação do etileno e, também, como antioxidante. A adição de nitrato de prata ao meio de cultura incrementou a taxa de sobrevivência de plântulas ($p=0.000$). As plântulas multiplicadas em meio WPM, com ausência de nitrato de prata, apresentaram uma baixa sobrevivência (22%), resultante do processo de senescência (Figura 4). A maior sobrevivência (48 %) foi observada em plântulas cultivadas em meio contendo $0,2 \mu\text{M}$ de AgNO_3 e conforme essa concentração, ocorreu uma redução na taxa de sobrevivência (Figura 4).

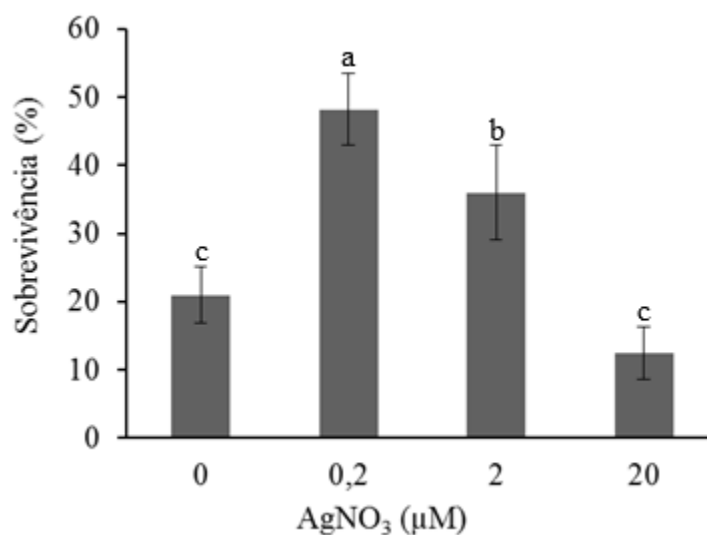


Figura 4 Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Comanthera bisulcata* (cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO_3)). Barras ($\pm\text{SE}$) seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com teste de Tukey

Em plântulas cultivadas em meio de cultura, contendo 20 μM de AgNO_3 , foi observada a presença de pontuações escuras na base das brotações, o que pode ser consequência da fitotoxicidade, indicando que a concentração 20 μM de AgNO_3 pode ser considerada alta para a multiplicação *in vitro* de plântulas de *Comanthera bisulcata*.

3.5 Controle da oxidação

A adição de PVP influenciou de forma significativa a sobrevivência de plântulas ($p=0.000$). Houve 36% de sobrevivência de plântulas cultivadas em meio suplementado com o antioxidante PVP, quando comparadas às plântulas cultivadas apenas em meio suplementado com sacarose (Figura 5).

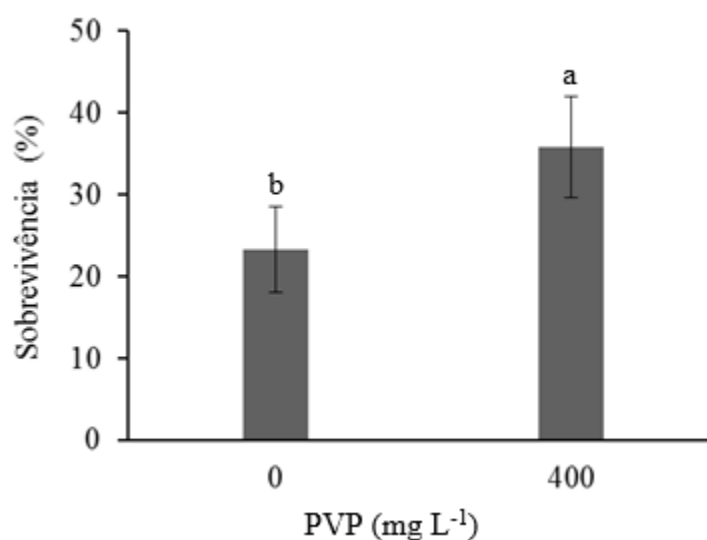


Figura 5 Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Comanthera bisulcata*. Cultivadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de nitrato de prata (AgNO_3) e com duas concentrações (0 e 400 mg L^{-1}) de PVP

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA et al., 2007). Essas substâncias podem atuar inibindo a síntese ou a ação de enzimas ligadas à oxidação dos polifenóis ou agir como adsorventes dessas substâncias. Os fenóis são adsorvidos pela polivinilpirrolidona (PVP), por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica, ou seja, as quinonas (ABDELWAHD et al., 2008). O PVP reage com os compostos oxidados e seu principal efeito no meio de cultura está relacionado com a capacidade de inibir a liberação de compostos fenólicos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

3.6 Efeito de diferentes fontes de citocininas

A combinação de reguladores de crescimento com polivinilpirrolidona (PVP) e o nitrato de prata aumentou a sobrevivência de plântulas ($p=0.002$), indicando que a baixa sobrevivência, após a multiplicação, também, pode ser resultante de um processo de senescência e/ou oxidação. As diferentes fontes de citocininas influenciaram de forma significativa o desenvolvimento de plântulas.

Dentre as três fontes de citocininas testadas, o efeito do TDZ foi superior, pois as plântulas cultivadas no meio que continham esse regulador apresentaram uma maior taxa de sobrevivência (76%) ($p=0.002$). A maior taxa de sobrevivência observada em plântulas cultivadas no meio suplementado com PVP, nitrato de prata, sacarose e auxina (ANA), combinados com diferentes fontes de citocininas (BAP, TDZ e KIN), foi o critério utilizado para a escolha desse grupo para definir a citocinina a ser usada para a multiplicação de plântulas (Figura 6).

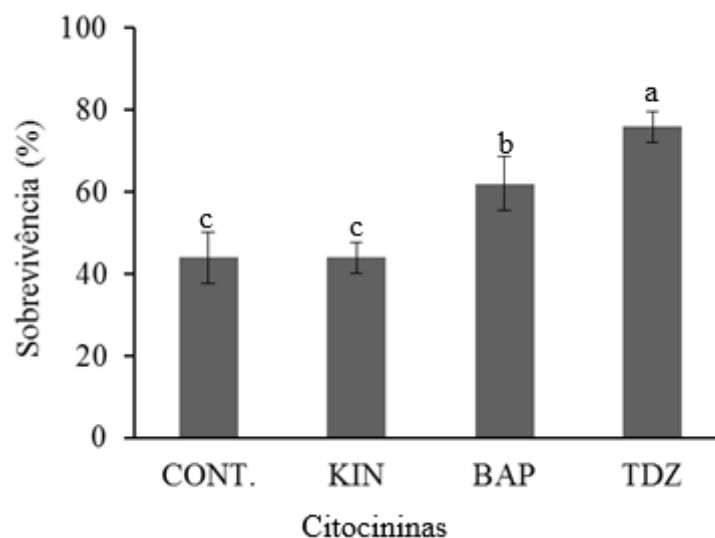


Figura 6 Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *Comanthera bisulcata*, cultivadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de nitrato de prata (AgNO_3) 400 mg L^{-1} de PVP e diferentes fontes de citocininas KIN (cinetina), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) e na ausência de citocininas (CONT.)

Pode - se atribuir a esse aumento, na porcentagem de plântulas sobreviventes, a um possível efeito sinérgico da ação conjunta das citocininas, do antioxidante PVP e do nitrato de prata (AgNO_3) que pode ter exercido a função, também, de antioxidante e/ou inibindo uma possível ação do etileno, geralmente, acumulado em ambientes fechados, sendo responsável por acelerar o processo de senescência nas plântulas cultivadas *in vitro*. A adição de antioxidante, junto com nitrato de prata, incrementou a sobrevivência de plântulas de grão de bico inoculadas *in vitro* (SANYAL et al., 2005).

As diferentes fontes de citocininas influenciaram de forma significativa a porcentagem de plântulas com organogênese indireta ($p=0.0001$) e a porcentagem de plântulas que apresentaram brotações ($p=0.0000$). O processo de organogênese indireta, que ocorreu na sempre viva *Comanthera bisulcata*,

pode ser descrito, inicialmente, como a formação de uma massa de células na coloração esverdeada, em que surgem as folhas (Figura 7A, B e C) e, posteriormente, essa massa de células pode originar uma ou mais brotações (Figura 7D). O meio WPM suplementado com sacarose, PVP (400 mg L⁻¹) e AgNO₃ (0,2 μM) induziu organogênese indireta (10%), mas a presença de citocininas (BAP, TDZ e KIN) aumentou a porcentagem de plântulas com organogênese indireta (Figura 8). A maior porcentagem de plântulas com organogênese indireta foi observada no meio suplementado com BAP ou com TDZ.

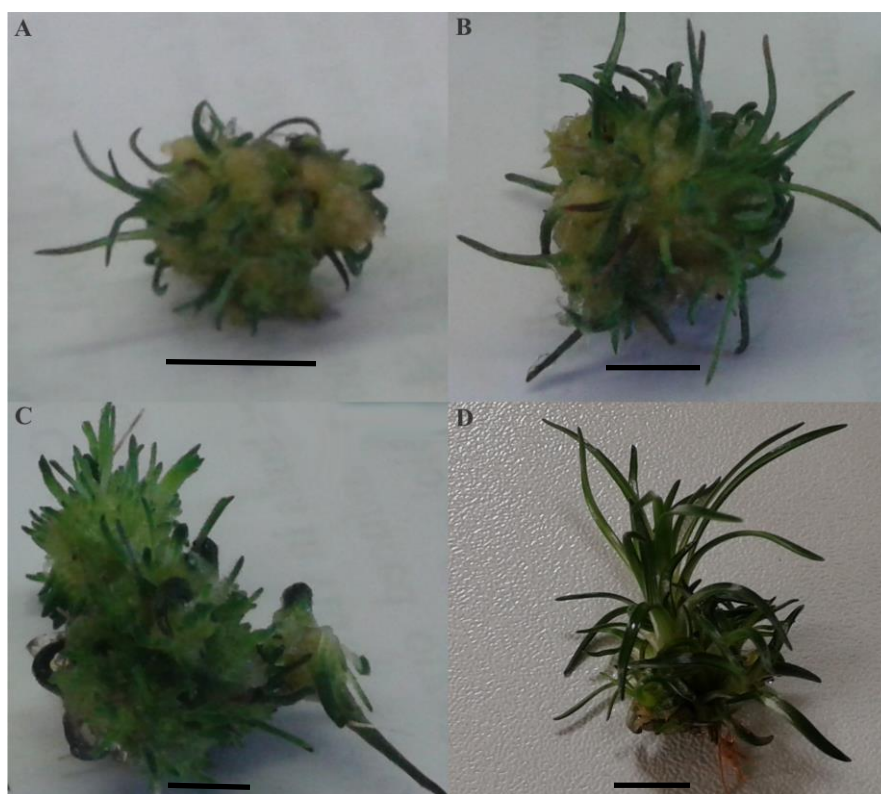


Figura 7 Plântulas de *Comanthera bisulcata* cultivadas *in vitro* em várias fases de desenvolvimento. (A) 15, (B) 30, (C) 60 e (D) 90 dias após o subcultivo. Barras representam 1 cm

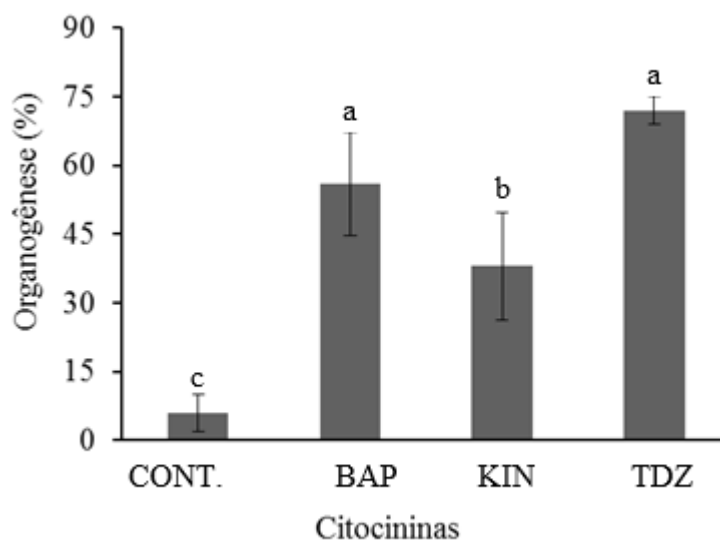


Figura 8 Porcentagem de plântulas com organogênese indireta de *Comanthera bisulcata* cultivadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de nitrato de prata (AgNO_3) 400 mg L^{-1} de PVP e diferentes fontes de citocininas KIN (cinetina), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) e na ausência de citocininas (cont.). Barras ($\pm\text{SE}$) seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas de acordo com Tukey

As brotações originadas de plântulas que apresentavam organogênese indireta foram observadas 60 dias, após o subcultivo e ocorreram apenas em meio de cultura suplementado com citocininas. As porcentagens de plântulas com brotações, observadas em meio com BAP, KIN e TDZ foram 56, 18 e 50%, respectivamente (Figura 8)

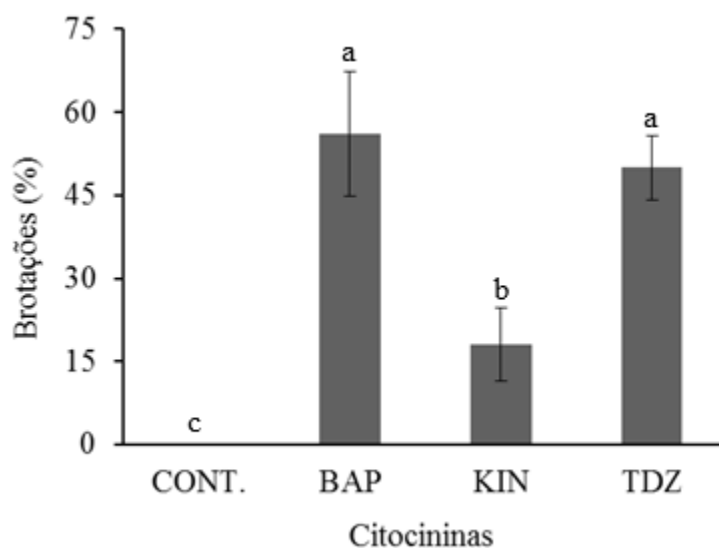


Figura 9 Porcentagem de plântulas com brotações pertencentes à *Comanthera bisulcata*. Cultivadas em meio WPM suplementado com 0,2 μM de nitrato de prata (AgNO_3) 400 mg L^{-1} de PVP e diferentes fontes de citocininas KIN (cinetina), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) e na ausência de citocininas (cont.). Barras ($\pm\text{SE}$) seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas de acordo com Tukey

A maior sobrevivência (76%) observadas em plântulas cultivadas em meio suplementado com TDZ foi o critério de escolha dessa citocinina na comparação do desenvolvimento de *C. bisulcata* no sistema semissólido e no sistema de imersão líquida, usando o protótipo Plantform®. Essa mesma citocinina TDZ foi utilizada para a micropropagação de *Comanthera elegans* (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2014).

3.7 Comparação entre sistema convencional de cultura e o sistema de imersão temporária (Plantform®)

Independentemente do sistema de cultivo líquido ou semissólido, a TCR (Taxa de crescimento relativo) do primeiro subcultivo (4,77 e 3,70) foi superior quando comparada a do segundo subcultivo (2,89 e 2,19). Indica que o maior incremento em peso fresco ocorre nos primeiros trinta dias de subcultivo. Nos dois subcultivos, a TCR do sistema líquido (4,77 e 2,89) foi superior ao do sistema semissólido (Tabela 1). O cálculo da taxa de crescimento relativo (TCR) reflete o aumento da matéria orgânica fresca, das plântulas num intervalo de tempo, sendo função do tamanho inicial, ou seja, do material pré-existente (BENINCASA, 2003), isto é, no dia do subcultivo.

Tabela 1 Multiplicação de plântulas pertencentes à *Comanthera bisulcata*. Cultivadas em sistema semissólido e em sistema de imersão temporária (Plantform®), durante duas subculturas. TCR (taxa de crescimento relativo) = (g. g⁻¹ dia⁻¹)

	Primeiro Subcultivo	Segundo Subcultivo
	TCR	TCR
Plantform®	4,77	2,89
Semissólido	3,70	2,19

A maior área de contato dos explantes com o meio de cultivo líquido e, conseqüentemente, uma maior absorção dos nutrientes, que ocorreu no biorreator Plantform®, (Figura 10), pode ter contribuído para um maior valor de TCR (taxa de crescimento relativo) quando comparado ao sistema de cultivo semissólido. Esse sistema pode limitar a absorção dos nutrientes, em razão de uma menor superfície de contato do explante com o meio de cultivo, o que pode ter ocasionado uma menor taxa de crescimento relativo no sistema semi-sólido.

Estudos realizados em espécie ornamental, como helicônia, usando o

sistema de imersão líquida, também, demonstraram a superioridade desse sistema em relação ao método tradicional de micropropagação usando o sistema semissólido (RODRIGUES et al., 2006).

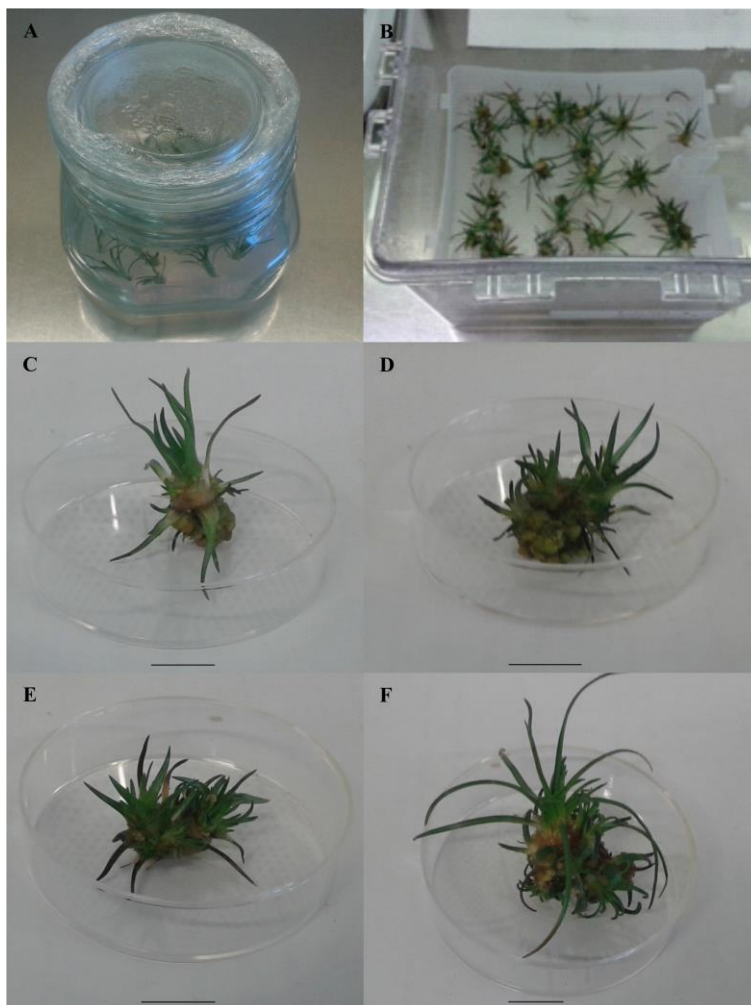


Figura 10 Plântulas de *Comanthera bisulcata* cultivadas *in vitro*. (A) Sistema semissólido e (B) Sistema de imersão temporária líquida (Plantform®). Plântulas cultivadas no sistema semissólido no final do primeiro (C) e do segundo (E) subcultivo. Plântulas cultivadas no sistema de imersão temporária líquida no final do primeiro (D) e do segundo (F) subcultivo. Barras representam 1cm

A taxa de multiplicação de plântulas no sistema de imersão líquido (Plantform®) foi de 1: 2.33, enquanto no sistema semissólido foi de 1: 2.06. Esse dado significa que a cada explante inicial originou 2.33 e 2.06 explantes para o sistema de imersão temporária líquida e para o sistema semissólido, respectivamente. Demonstra que o sistema de imersão temporária líquida é mais eficiente, para promover a multiplicação de plântulas, quando comparado ao sistema semissólido.

Realizando a caracterização individual de plântulas, cultivadas nos dois sistemas (Tabela 2), verificou se que as plântulas com o maior peso médio (0,86g) foram observadas no sistema de imersão líquido e as de menor peso no sistema semissólido (0,20g) ($p=0.000$). As variáveis, altura média de plântulas, o número de folhas por planta, o diâmetro de roseta, as porcentagens de plântulas com organogênese indireta não apresentaram diferença significativa entre os sistemas semissólido e o de imersão temporária líquida.

No sistema de imersão temporária (Plantform®), ocorre a constante renovação do ar, durante o período de transferência do meio, eliminando os possíveis gases prejudiciais, produzidos pelo metabolismo das plantas que, normalmente, acumulam-se na fase gasosa dos sistemas (LAMBARDI et al., 2015), e esse fator, também, pode ter contribuído para o melhor desenvolvimento das plântulas de *C. bisulcata* no sistema de imersão líquida quando comparado ao semissólido (Figura 10).

Tabela 2 Caracterização de plântulas pertencentes à *Comanthera bisulcata* cultivadas em sistema semissólido e o sistema de imersão temporária (Plantform®), no final da segunda subcultura. Letras diferentes em cada coluna indicam valores significantes diferentes a $p \leq 0.05$. PM (peso médio), AM (altura média), FL (folhas), RS (roseta), OI (organogênese indireta) e HP (Hiper-hidricidade)

	PM (g)	AM (cm)	FL (n)	Ø RS (cm)	OI (%)	HP (%)
Plantform®	0,86 a	2,93 a	18,20 a	3,03 a	73,00 a	43,00 a
Semissólido	0,20 b	3,03 a	15,30 a	3,60 a	90,00 a	0,00 b

Entretanto, no sistema de imersão líquida, foram observadas plântulas com hiper-hidricidade (43%). A hiper-hidricidade é caracterizada por uma acumulação excessiva de água pelos tecidos vegetais (CHAKRABARTY et al., 2006). Em condições *in vitro*, a hiper-hidricidade é incentivada pela alta umidade e pelo contato direto dos explantes com água. As plantas hiper-hídricas têm uma aparência translúcida com superfície brilhante e frágil (MAJADA; SANCHEZ-TAMÉS, 2003). Uma possível solução para a redução da hiper-hidricidade, observada em plântulas de *C. bisulcata*, pode ser o cultivo em um tempo de imersão menor que a condição testada (12 min/8 horas)

4 CONCLUSÕES

Para o estabelecimento *in vitro* de *Comanthera bisulcata*, recomenda-se a desinfestação das sementes em cinco minutos de imersão ao NaOCl (1% de cloro ativo) e as sementes podem ser germinadas numa faixa de pH, variando de 4,4 a 5,8. Durante a fase de multiplicação, a senescência de plântulas pode ser reduzida com 0,2 μM de AgNO_3 e a oxidação com 400 mg L^{-1} do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) e 2,68 μM de ANA + 2,27 μM de TDZ é adequado para induzi-la a brotações. Os valores da taxa de crescimento relativo e do peso médio de plântulas demonstraram a superioridade do sistema de imersão líquida temporária (Plantform®) em relação ao sistema semissólido durante a micropropagação de *Comanthera bisulcata*.

REFERÊNCIAS

- ABDELWARD, R. et al. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. **African Journal of Biotechnology**, África, v. 7, n. 8, p. 997-1002, 2008.
- ALVES, E. et al. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: Editora da UFLA, 2004. 43 p. 1 Apostila.
- BARRETO, L. C.; ECHTERNACHT, L.; GARCIA, Q. S. Seed coat sculpture in *Comanthera* (Eriocaulaceae) and its implications on taxonomy and phylogenetics. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 299, n. 1, p. 1461–1469, Apr. 2013.
- BENELLI, C.; MOREIRA, F. C.; CARLO, A. de. ‘Plant Form’, a temporary immersion system, for *in vitro* propagation of *Myrtus communis* and *Olea europaea*. In: INTERNATIONAL ISHS SYMPOSIUM ON PRODUCTION AND ESTABLISHMENT OF MICROPROPAGATED PLANTS, 6., 2015, Italy. **Proceedings...** Italy: ISHS, 2015. p. 19-24.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 36 p.
- BIODIVERSITAS. **Revisão da lista das espécies da flora e da fauna ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2007. 104 p.
- CAMPBELL, L. M. Pólen morfologia de xyridaceae (poales) e seu potencial sistemática. botânico. **Revisão**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 428-439, jan. 2012.
- CAMPBELL, L. M. Xyridaceae. Em: SMITH, N. et al. (Ed.). **Florescendo plantas do neotrópico**. Princeton: Princeton University Press, 2004. p. 492-493.
- CHAKRABARTY, D. S. et al. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 377-388, Dec. 2006.
- COAN, A. I.; ROSA, M. M.; SCATENA, V. L. Embryology and seed development of *Syngonanthus caulescens* (Poir.) Ruhland (Eriocaulaceae–Poales). **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 148–156, 2007.

ENRICO, G. et al. Comparison between a conventional culture system and Plantform bioreactor in *Quercus robur* micropropagation. In: INTERNATIONAL ISHS SYMPOSIUM ON PRODUCTION AND ESTABLISHMENT OF MICROPROPAGATED PLANTS, 6., 2015, Italy. **Proceedings...** Italy: ISHS, 2015. p.

FERREIRA, J. P. et al. Enraizamento *in vitro* de clones de mamoeiro ‘Tainung 01’. **Ciência Agronômica**, Jaboticabal, v. 42, n. 2, p. 563-566, 2011.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; LIMA, G. P. F. Avaliação da aplicação exógena de poliaminas no crescimento de calos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1206-1210, dez. 2009.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1. 3th. ed. Dordrecht: Springer, 2008. 520 p.

GIULIETTI, A. M. et al. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 1, p. 1–19, jan./mar. 2012.

GIULIETTI, A.M. et al. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, n. 3, p. 632–639, Jan. 2005.

GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 179–193, jan. 1987.

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

KARNOVSKY, M. J. A. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

LAMBARDI, M. et al. Improvement of shoot proliferation by liquid culture in temporary Immersion. In: INTERNATIONAL ISHS SYMPOSIUM ON PRODUCTION AND ESTABLISHMENT OF MICROPROPAGATED PLANTS, 6., 2015, Italy. **Proceedings...** Italy: ISHS, 2015.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul: subsp. mucugensis. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 502-510, maio/jun. 2011.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 421-427, Jan. 1980.

LUCAS, G. C. et al. Microscopia: uma importante ferramenta no estudo da interação planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 19, n. 1, p. 337-385, dez. 2011.

MAJADA, J. P.; SANCHEZ-TAMES, R. Ecofisiologia del cultivo *in vitro* aclimatación de plantas. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SANCHEZ, A. (Ed.). **Ecofisiologia vegetal**. Espana: Thompson, 2003. p. 1017-1054.

MINAS GERAIS. Lista de espécies ameaçadas de extinção no estado de Minas Gerais. **Diário do Executivo, Legislativo e Publicações de Terceiros**, Belo Horizonte, 30 out. 1997. p. 10-12.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista oficial das especies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Brasília: IBAMA, 2008. 55 p. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio>>. Acesso em: 05 mar. 2015.

MOREIRA, F. C. **Avaliação de sistemas de cultivo das sempre vivas *Comanthera elegans* (Bong.) L.R. Parra & Giul. e *C. bisulcata* (Körn) L.R. Parra & Giul.** 2010. 100 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

MOREIRA, F. C. et al. Dehydration and cryopreservation of *Xyris cipoensis* seeds. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1039, n. 1, p. 243-246, July 2014.

NUNES, U. R. et al. Effect of the crop time, irrigation and dry soil seeds permanence in the initial development of *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 64-70, fev. 2008.

OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *S. elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* Silveira (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, n. 3, p. 639-645, 2005.

OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S. Germination characteristics of *Syngonanthus* seeds (Eriocaulaceae) in campos rupestres vegetation in south-eastern Brazil. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 21, n. 1, p. 39–45, Mar. 2011.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 37, n. 1, p. 32-39, jan./fev. 2013.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans* Bong.) Ruhland: an ornamental species. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 347-353, jul./set. 2014.

RODRIGUES, P. H. V. et al. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 29-35, dez. 2006.

SANYAL, S. et al. Agrobacterium mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 1, p. 1135-1146, 2005.

SCATENA, V. L.; LEMOS-FILHO, J. P.; LIMA, A. A. A. Morphology of post-seminal development of *Syngonanthus elegans* and *S. niveus* (Eriocaulaceae). **Acta Botanica Brasílica**, Belo Horizonte, v. 10, p. 85–91, 1996.

SILVA, A. B. et al. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42 n. 9, p. 145-157, set. 2007.

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**, Lavras, v. 33, nesp., p. 1847 -1852, 2009.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2008.

SOUZA, T. J. T. et al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.

WELANDERA, M. et al. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 227–232, Sept. 2014.

WOJTANIA, A. et al. Sucrose and cytokinin interactions in relation to ethylene and abscisic acid production in the regulation of morphogenesis in *pelargonium × hortorum* l.h. bailey in vitro. **Acta Biologica Cracoviensia - Series Botanica**, Krakow, v. 57, n. 1, p. 62–69, Jan. 2015.

CAPÍTULO 3 Estabelecimento e conservação *in vitro* de *Xyris cipoensis*

Smith & Downs: espécie ameaçada de extinção e ornamental

RESUMO

Xyris cipoensis é uma espécie herbácea, endêmica, ocorre nos Campos Rupestres Brasileiros, a qual apresenta potencial ornamental. Objetivou-se realizar a micropropagação e a conservação *in vitro* de *Xyris cipoensis*. As sementes foram descontaminadas em diferentes tempos de exposição ao NaOCl (1, 5, 10, 15 e 20 minutos). O meio WPM suplementado com diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 15 e 20 g L⁻¹) foi avaliado. As sementes foram armazenadas em nitrogênio líquido. O descongelamento foi realizado em diferentes períodos (30, 60 e 120 segundos). Diferenças significativas foram observadas para diferentes períodos de descontaminação ($p < 0.0001$), concentração de sacarose ($p = 0.0004$) e período de descongelamento ($p < 0.0001$). A maior porcentagem de descontaminação (90%) e de germinação (84%) foi observada após cinco minutos de exposição ao NaOCl e usando 15g L⁻¹ de sacarose, respectivamente. Os períodos de descongelamento (30, 60 e 120 segundos) resultaram em uma taxa de germinação de 24, 77 e 39%, respectivamente. Um eficiente protocolo para o estabelecimento *in vitro* foi obtido e uma maior viabilidade pós-descongelamento das sementes criopreservadas foi alcançada após o descongelamento por 60 segundos.

Palavras-chave: Espécie nativa. Planta ornamental. Cultura *in vitro*. Longo tempo de armazenamento. Espécie endêmica.

ABSTRACT

Xyris cipoensis is an herbaceous species, which is endemic in Brazil's *campos rupestres* that have ornamental potential. The objectives of this study were to realize the micropropagation and conservation *in vitro* of *Xyris cipoensis*. Seeds were decontaminated with different time exposure to NaOCl (1, 5, 10, 15 e 20 minutes). WPM medium with different sucrose concentrations (5, 10, 15 e 20 g L⁻¹) were tested. Seeds were stored in liquid nitrogen. Thawing was performed for different periods. A significant difference was observed among the different decontamination periods ($p < 0.0001$), the sucrose concentration ($p = 0.0004$) and thawing periods ($p < 0.0001$). The higher percentage of decontaminated and germination (90% and 84%) was observed after five minutes exposure to NaOCl and using 15g L⁻¹ sucrose, respectively. The thawing period (30, 60 e 120 seconds) regarding germination rates (24, 77 and 39%), respectively. An efficient protocol for the *in vitro* establishment was obtained and a higher post-thaw viability of cryopreserved seeds was reached after thawing for 60 seconds.

Keywords: Native species. Ornamental plant. *in vitro* culture. Long-term storage. Endemic species.

1 INTRODUÇÃO

Xyridaceae (Poales) é uma família predominantemente tropical e subtropical que abrange cinco gêneros e, aproximadamente, 415 espécies, popularmente, conhecidas como sempre vivas. As plantas pertencentes à família Xyridaceae são herbáceas, perenes e acaules, predominantemente, com flores amarelas, que ocorrem, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais alagadas e úmidas. Algumas dessas espécies podem crescer em condições ambientais específicas e restritas e sobreviver como populações pequenas e isoladas (CAMPBELL, 2012).

O gênero *Xyris* é amplamente distribuído nos campos rupestres (Campo Rupestre), sendo frequentemente encontrado na Serra do Espinhaço e em Montanhas Gerais da Serra do Goiás no Brasil (PIRANI; MENEZES, 1988). Para o gênero *Xyris*, 15 espécies estão listadas como espécies ameaçadas de extinção (MINC, 2008) e entre estas podem ser mencionada *Xyris cipoensis*. Uma das principais causas da redução da população natural dessas espécies é a extração das inflorescências para a comercialização antes da produção ou dispersão de sementes (MENDONÇA; LINS, 2000; PIRANI; MENEZES, 1988). O uso inadequado pode levar a uma rápida perda de diversidade biológica e extinção dessas espécies, gerando, portanto, uma necessidade urgente de desenvolver ações de conservação complementares, *in situ* e *ex situ*, para permitir a preservação destas espécies (MINC, 2008; PIRANI; MENEZES, 1988).

Dentre as principais formas de conservação *ex situ* podem incluir métodos convencionais, tais como os bancos de sementes e as coletas de campo, ou pode envolver abordagens biotecnológicas de laboratório, tais como bancos de DNA, conservação *in vitro* e criopreservação. Em algumas técnicas de conservação *in vitro*, os tecidos e órgãos da planta são, normalmente, mantidos

em baixa temperatura, mas acima da temperatura de congelamento da água. Por outro lado, as amostras, em um estado criogênico, são mantidas a temperaturas ultrabaixas (LAMBARDI; CARLO, 2003; OZUDOGRU et al., 2013).

Entre as técnicas de conservação *ex situ*, a criopreservação é considerada uma das mais promissoras. Esta técnica significa a conservação do material biológico em nitrogênio líquido (NL) a -196 °C. Esta ultrabaixa temperatura reduz drasticamente todas as reações metabólicas, assegurando a viabilidade de armazenamento em longo prazo (ENGELMANN, 2011, 2000).

Desde o primeiro relato de sucesso na criopreservação de plantas, publicado em 1960, ao longo dos últimos 50 anos, vários procedimentos criogênicos têm sido desenvolvidos, para quase todas as culturas, economicamente, importantes, incluindo: culturas básicas, plantas hortícolas e espécies florestais de zonas tropical e temperada (ENGELMANN, 2004; FENG, 2011; LI et al., 2014; OZUDOGRU et al., 2013; SMITH; DOWNS, 1968; WANG, 2004) e estas técnicas foram propostas para o armazenamento de sementes em longo prazo para sementes pequenas e ortodoxas (PRITCHARD, 2004) e, também, para as sementes recalcitrantes (PRITCHARD; NADARAJAN, 2008). Para a família Xyridaceae, diversas pesquisas têm focado seus estudos em taxonomia, anatomia (CAMPBELL, 2012; REMIZOWA et al., 2012; MOTA; WANDERLEY, 2014) e biologia reprodutiva dessas espécies (ORIANI; SCATENA, 2011, 2012).

Objetivou-se, dessa maneira, o estabelecimento *in vitro* e a criopreservação de sementes de *Xyris cipoensis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As inflorescências de *X. cipoensis* foram coletadas em ambientes de ocorrência natural, localizados perto da cidade de Diamantina (18° 20'S, 43° 53'W), no estado de Minas Gerais, Brasil. As inflorescências foram removidas, manualmente, a partir de plantas parentais, quando as sementes apresentam a coloração marrom escuro, o que sinaliza que elas estão prontas para a dispersão e têm alta viabilidade. Posteriormente, as inflorescências foram processadas, manualmente, para remoção das sementes.

2.2 Estabelecimento *in vitro*

Para descontaminação, em câmara de fluxo laminar, amostras de 50 mg de sementes (\pm 800 sementes) foram colocadas em tubos de plástico estéreis de 25 mL de fundo cônico e 10 mL de etanol (70% de concentração final) foram adicionados. Após 30 segundos, utilizando uma pipeta de Pasteur estéril, o etanol foi removido e 10 mL de NaOCl (1% de cloro ativo) foram adicionados para a descontaminação por diferentes tempos (1, 5, 10 e 15 minutos). Em seguida, o NaOCl foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, as sementes foram lavadas três vezes em água estéril antes da inoculação em meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose (MOREIRA et al., 2014). O meio foi solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após a inoculação, as sementes foram mantidas numa câmara de sala de crescimento sob 36 mol m⁻² s⁻¹ de irradiância, foto período de 16 horas e temperatura de 25 \pm 2 °C. A

eficiência de descontaminação e a porcentagem de germinação foram avaliadas 30 dias, após o cultivo.

Para avaliar o efeito da sacarose sobre a germinação das sementes, amostras de 50 mg de sementes foram esterilizadas com etanol a 70%, durante 30 segundos, seguida por descontaminação em NaOCl (1% de cloro ativo) durante cinco minutos. As sementes foram inoculadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 15 e 20 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 antes da esterilização. Após a inoculação, as sementes foram mantidas sob as mesmas condições de crescimento acima descritas e, depois de 30 dias, a porcentagem de germinação foi avaliada.

2.3 Grau de umidade das sementes

Para determinar o teor de umidade das sementes, expresso em um percentual de peso fresco [U (%)], antes do processo de criopreservação, três amostras de 50 mg de sementes após a coleta, foram pesadas (peso fresco-FW) e posteriormente, foram secas em estufa de circulação de ar forçado (105°C) durante 24 horas. Em seguida, estas mesmas sementes foram pesadas (Peso Seco-DW). Os dados foram submetidos à equação: $U (\%) = 100 * (FW - DW) / FW$ (BRASIL, 2009).

2.4 Congelamento, descongelamento e retomada do crescimento

Para a criopreservação, as sementes foram transferidas para criotubos de 2 mL e mergulhados em nitrogênio líquido, onde permaneceram durante 24 horas. Após este período, as amostras foram descongeladas em banho maria a uma temperatura de 38 ± 2 °C, durante diferentes períodos (30, 60 e 120 segundos). Após o descongelamento, as sementes foram descontaminadas em

etanol a 70%, por 30 segundos e NaOCl (1% de cloro ativo), durante cinco minutos e, em seguida, inoculadas em meio WPM suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose. Depois da inoculação, as sementes foram mantidas sob as mesmas condições de crescimento acima descritas e, aos 30 dias após de incubação, a percentagem de germinação foi avaliada.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura

As possíveis mudanças morfológicas que podem ocorrer em sementes de *X. cipoensis*, durante a criopreservação, foram investigadas com o uso de microscopia eletrônica de varredura. As sementes criopreservadas que foram descongeladas, durante 30, 60 e 120 segundos e as sementes não criopreservadas (controle) foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) modificado (glutaraldeído a 2,5%, 2,5% de formaldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2) e mantidas em refrigeração a 8 °C durante 24 horas. As amostras foram lavadas três vezes em tampão de cacodilato 0,05 M, durante 10 minutos.

Em seguida, as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) e desidratadas em série ascendente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), durante 10 minutos em cada solução e três vezes com acetona pura (100%). As amostras foram montadas em porta-amostras (stabs). A secagem das amostras foi realizada a ponto crítico (Bal-Tec ®), o CO₂ foi usado como o meio para obter a desidratação das amostras. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro (Sputter Bal-Tec ®) e, finalmente, visualizadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVPP (ALVES, 2004).

2.6 Análise estatística

Em todos os experimentos, para cada tratamento, utilizaram -se 50 repetições e cada repetição consistiu de cinco sementes inoculadas por tubo. O delineamento experimental adotado foi o DIC. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram analisadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o software de estatística SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento *in vitro*

Houve diferença significativa para os tempos de desinfestação de sementes ($p=0,0001$). Após cinco minutos de exposição ao NaOCl, 90% das sementes foram descontaminadas e 60% germinaram (Figura 1 A-B). A redução na taxa de germinação obtidas após exposição ao NaOCl acima de cinco minutos pode estar associada com a toxicidade ao NaOCl (hipoclorito de sódio), considerando que as sementes com baixo teor de umidade podem permitir uma rápida absorção da solução de hipoclorito de sódio. Além disso, uma rápida absorção de água pode causar danos nas membranas das células, reduzindo a sua semipermeabilidade e promovendo uma maior absorção da solução contendo hipoclorito (SAKAI, 1960).

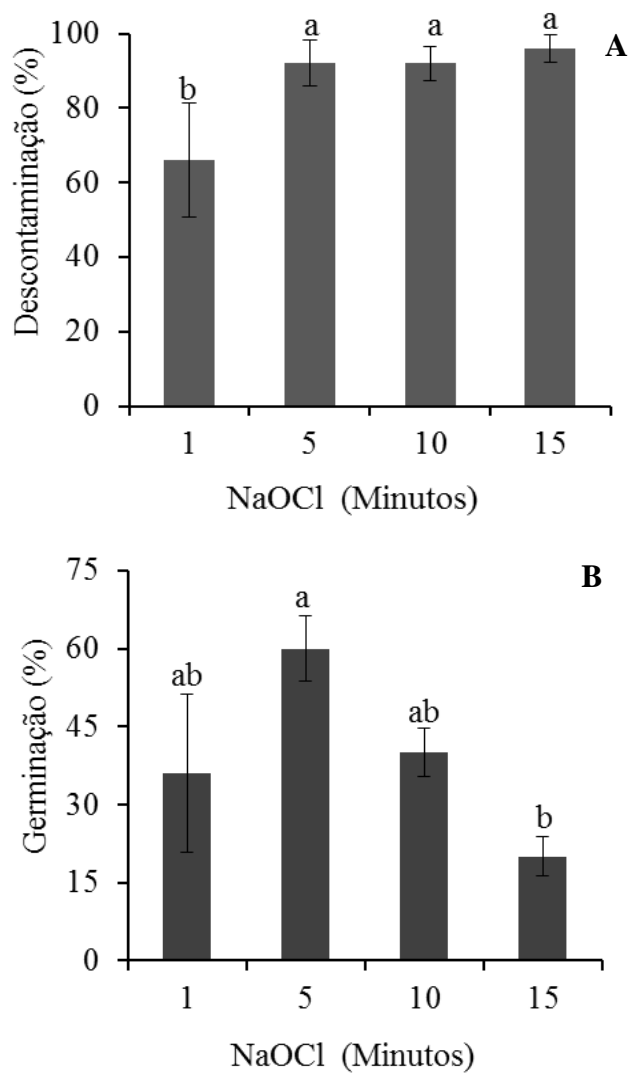


Figura 1 Percentagem de descontaminação (1A) e germinação (1B) de sementes de *Xyris cipoensis* após a exposição ao NaOCl por diferentes períodos. Barras (\pm SE) com as mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey

Para a cultura *in vitro*, a concentração de sacarose afeta o estado osmótico e o metabolismo da planta, o que pode influenciar no crescimento

(NICOLOSO et al., 2003). A concentração de sacarose influenciou significativamente na taxa de germinação ($p=0,0004$). A germinação *in vitro* aumentou, gradualmente, até a concentração de 15 g L^{-1} de sacarose, em que foi observada uma taxa de 84% de germinação (Figura 2). Em mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), quando a concentração de sacarose foi de 20 g L^{-1} foi observada uma redução significativa na percentagem de sementes germinadas. Em determinadas concentrações, a sacarose afeta a resistência osmótica do meio, prejudicando, assim, no processo de germinação, por meio da redução da água disponível, para absorção realizada pelas sementes e essa redução na disponibilidade de água pode retardar ou reduzir a taxa de germinação (GEORGE, 2008; SILVA et al., 2014).

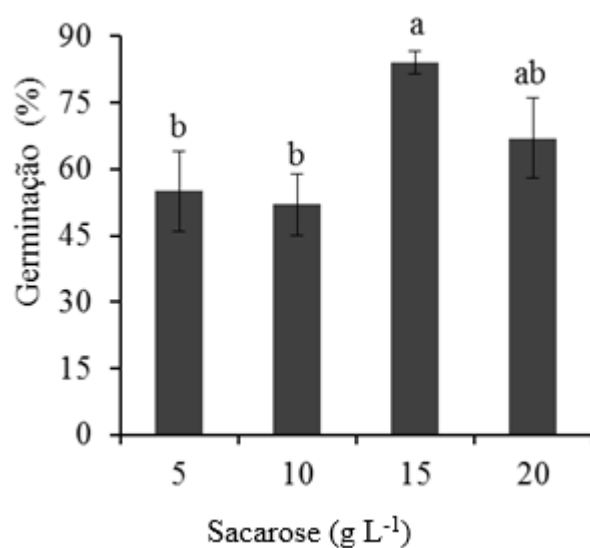


Figura 2 Germinação de *Xyris cipoensis* *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose para o estabelecimento *in vitro*. Barras (\pm SE) com a mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey

3.2 Grau de umidade das sementes

As sementes de *X. cipoensis*, após a coleta em ambientes de ocorrência natural, apresentavam um grau de umidade de 12% e foram submetidas diretamente ao processo de criopreservação sem aplicação da técnica de desidratação. O grau de umidade apresentado por sementes, antes do processo de congelamento, é um dos pontos chaves para a criopreservação. Em embriões de *Zea mays*, que apresentavam como grau de umidade 11%, ou seja, próximo ao apresentado por sementes de *X. cipoensis* foi observado um aumento significativo na sobrevivência e a na emergência de embriões pós-descongelamento (WANG et al., 2008).

Estudos mostraram que o grau de umidade em sementes de *X. cipoensis*, durante a dispersão, é de cerca de 14%, sugerindo que elas são ortodoxas (ABREU; GARCIA, 2005). As sementes ortodoxas suportam baixas temperaturas, incluindo temperaturas abaixo de zero utilizada no armazenamento em longo prazo sem ter a sua viabilidade comprometida. A longevidade fisiológica de sementes ortodoxas aumenta com a diminuição da temperatura de armazenamento ou grau de umidade (PRITCHARD; NADARAJAN, 2008).

3.3 Congelamento, descongelamento e retomada do crescimento

O processo de congelamento e de descongelamento resulta em um duplo estresse durante o processo de criopreservação e a eficiência da criopreservação, ou seja, a retomada do crescimento após o processo de criopreservação, também, pode ser dependente da velocidade de congelamento e de descongelamento (PRITCHARD; NADARAJAN, 2008). Neste estudo, o período de descongelamento testado foi significativo ($P < 0, 0001$). A maior taxa de

germinação (77%) de sementes foi observada após o descongelamento durante 60 segundos (Figura 3).

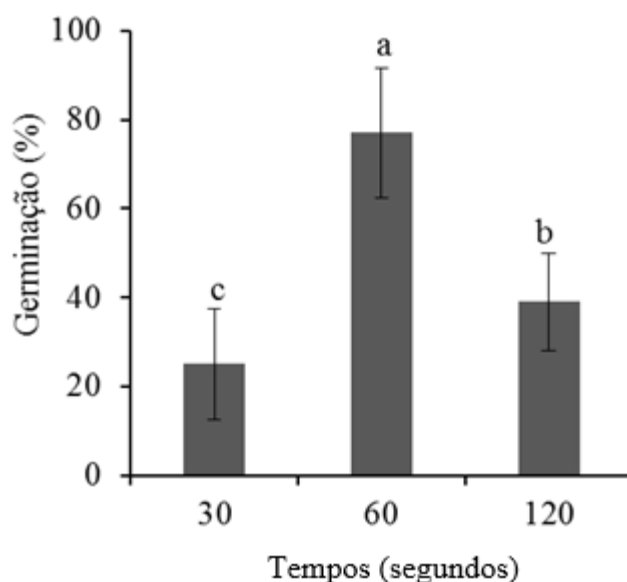


Figura 3 Efeito de diferentes períodos de descongelamento na germinação de sementes criopreservadas de *Xyris cipoensis*. Barras (\pm SE) com a mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey

A criopreservação das sementes ortodoxas representa uma excelente ferramenta para a preservação da diversidade genética de *Xyris cipoensis*. Sendo considerada a mais conveniente e rentável quando comparada a outros métodos tradicionais de conservação, porque este método pode ser utilizado em longo prazo de armazenamento (PRITCHARD; NADARAJAN, 2008; WALTERS et al., 2004). Outras vantagens incluem: a capacidade para armazenar as sementes em vários locais, proporcionando, assim, uma alternativa segura contra a perda acidental (PRITCHARD; NADARAJAN, 2008). Considerando que as sementes *X. cipoensis* têm 1,06 milímetros de comprimento, 0,37 mm de largura e 0,01

mg de massa seca (ABREU; GARCIA, 2005), o armazenamento de sementes em recipiente de nitrogênio líquido representaria uma forma simples e econômica de conservação *ex situ* da diversidade genética em um pequeno espaço.

Para investigar os possíveis danos físicos que possam ocorrer, durante o processo de criopreservação, a taxa de germinação de sementes criopreservadas foi comparada a não criopreservadas. Observou-se uma redução de 7% na taxa de germinação de sementes criopreservadas em relação às sementes não criopreservadas (Fig. 2 e 3). O congelamento pode provocar danos citológicos, como plasmólise, aumento na heterocromatina e encolhimento nuclear. O congelamento diminuiu a atividade da glutatona redutase (GR) e da superóxido dismutase (SOD) e resulta, também, em uma baixa atividade da redutase desidroascorbato (DHAR) e promove a atividade da peroxidação lipídica da membrana o que resultou num aumento de, aproximadamente, três vezes a mais no conteúdo de malondialdeído. Estes resultados foram observados em pós-descongelamento de embriões de *Zea mays*, após o processo de criopreservação (WANG et al., 2008). Estudos sobre criopreservação conduzidos para *X. cipoensis* mostraram que sementes desidratadas, durante cinco horas, apresentaram 94% de germinação, após a criopreservação. No tratamento controle (sementes desidratadas durante cinco horas, mas não expostas ao nitrogênio líquido), houve uma redução na taxa de germinação de 26% (MOREIRA et al., 2014). Esses autores explicaram essa anomalia como uma indução de dormência secundária pela desidratação, provavelmente, pelo acúmulo de ácido abscísico endógeno. A exposição de sementes ao nitrogênio líquido pode promover a germinação por induzir a síntese de giberelina, naturalmente, que é antagonista ao ácido abscísico, ocorrendo a quebra de dormência das sementes.

A descontaminação de sementes, seguindo a desidratação, durante cinco horas antes da criopreservação, mostrou uma taxa de germinação de 94% (MOREIRA et al., 2014) e as sementes que foram submetidas à criopreservação sem desidratação, anteriormente, após descontaminação apresentavam uma taxa de germinação de 77%

3.4 Microscopia eletrônica de varredura

O rápido descongelamento das amostras que apresentam baixo teor de umidade pode causar danos físicos nas sementes (PRITCHARD; NADARAJAN, 2008). Para investigar os possíveis danos físicos, uma varredura foi realizada sobre a estrutura externa das sementes (Fig. 4). As sementes criopreservadas (Fig. 4B, 4C e 4D) mostraram alterações morfológicas quando comparadas com aquelas que não foram criopreservadas (Fig 4A). As alterações na morfologia externa foram aumentadas quando as sementes foram descongeladas em tempos 60 e 120 segundos (Fig. 4C e 4D). Estas alterações morfológicas podem ser o resultado de um estresse, durante o processo de descongelamento, pois, a alteração aumenta em função do tempo de descongelamento. No entanto, nenhum dano foi visualizado na estrutura externa das sementes criopreservadas (Fig. 4 A, B, C e D).

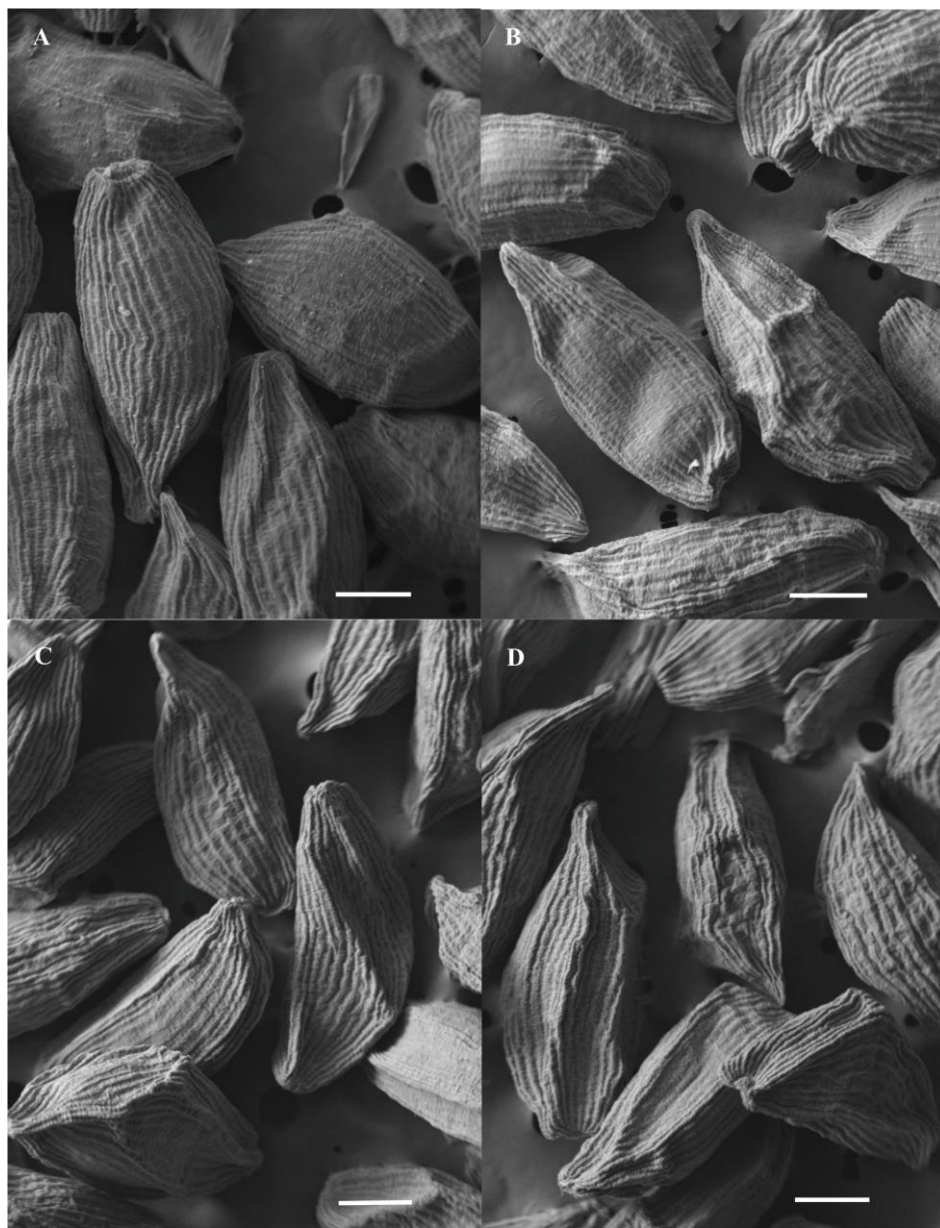


Figura 4 Sementes de *Xyris cipoensis*. Sementes não criopreservadas (A) e as sementes criopreservadas nos tempos de descongelamento 30 (B), 60 (C) e 120 (D) segundos. Barras representam 200 μm .

Estudos sobre alterações citológicas e fisiológicas, durante a criopreservação de sementes de *X. cipoensis*, são necessários para melhor elucidação da redução da taxa de germinação com o tempo de descongelamento. Os resultados confirmam a viabilidade da preservação *ex situ* de sementes *Xyris cipoensis* em nitrogênio líquido. O grau de umidade natural (12%) de sementes *Xyris cipoensis*, antes do congelamento, é um dos pontos chave para o sucesso da criopreservação, pois pode limitar a cristalização e/ou recristalização, durante os períodos de congelamento e de descongelamento, respectivamente. Além disso, evitar a formação de cristais de gelo intracelular tem sido considerado a principal razão para evitar a morte celular, após a criopreservação (MAZUR, 2004).

4 CONCLUSÕES

Um protocolo eficiente para o estabelecimento *in vitro* de *Xyris cipoensis* foi obtido e uma maior viabilidade pós-descongelamento das sementes criopreservadas foi atingido após o descongelamento a 38°C, durante 60 segundos. Essa condição, provavelmente, pode manter a qualidade das sementes e, conseqüentemente, a conservação de recursos genéticos valiosos por muitas décadas. Estes resultados promissores podem contribuir para a criação de um criobanco de sementes espécies endêmicas e vulneráveis pertencentes à família Xyridaceae do Campo Rupestre Brasileiro. Além disso, é uma alternativa para bancos de sementes convencionais para apoiar a futura reintrodução dessas espécies na natureza em áreas onde a população encontra-se reduzida em virtude da atividade extrativista.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. E. P.; GARCIA, Q. S. Efeito da luz e da temperatura na germinação de Sementes de Quatro Espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae) ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, p. 149-154, ago. 2005.
- ALVES, E. et al. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: Editora da UFLA, 2004. 43 p. 1 Apostila.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA, 1992. 185 p.
- _____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa, 2009. 395 p.
- BRITO, S. L. et al. *In vitro* morfogênese de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 502-5010, maio/jun. 2011.
- CAMPBELL, L. M. Pólen morfologia de xyridaceae (poales) e seu potencial sistemática. botânico. **Revisão**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 428-439, jan. 2012.
- _____. Xyridaceae. Em: SMITH, N. et al. (Ed.). **Florescendo plantas do neotrópico**. Princeton: Princeton University Press, 2004. p. 492-493.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, H. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa, 2003. 22 p.
- COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de Sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 633-642, ago. 2004.
- ENGELMANN, F. Criopreservação plant: progresso e perspectivas. **In Vitro Cellular, Biology & Desenvolvimento – Planta**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.
- _____. Importância da criopreservação para a conservação dos recursos genéticos vegetais. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Criopreservação de germoplasma tropical plant: o progresso da pesquisa atual e aplicações**. Tsukuba: JIRCAS, 2000. p. 8-20.

_____. O uso de biotecnologia para a conservação da biodiversidade vegetal. **In Vitro e Biologia do Desenvolvimento**, Gaithersburg, v. 47, n. 1, p. 5-16, fev. 2011.

FENG, C. H. et al. Criopreservação de batata doce (*Ipomoea batatas*) e sua erradicação patógeno por crioterapia. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 1, p. 84-93, Jan./Feb. 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um computador sistema de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 1039-104, jan. 2011.

GEORGE, E. F. **Propagação vegetal por cultura de tecidos: parte 1**, a tecnologia. Edington: Exegetics, 2008. 1574 p.

GIULIETTI, A. M. Estudos em sempre vivas: taxonomia com ênfase NAS Espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 329-377, jan. 1996.

KARNOVSKY, M. J. A. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

LAMBARDI, M.; CARLO, A. de. Aplicação de cultura de tecidos para a conservação de germoplasma de árvores temperadas de folha larga. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Ed.). **Micropropagação de woody árvores e frutas**. Holanda: Kluwer Academic, 2003. p. 815-840.

LI, B.-Q. et al. Shoot regeneration and cryopreservation of shoot tips of apple (*Malus*) by encapsulation-dehydration. **In Vitro Cellular, Biology & Desenvolvimento – Planta**, Columbia, v. 50, n. 3, p. 357-368, May 2014.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 421-427, Jan. 1980.

LUCAS, G. C. et al. Microscopia: uma importante ferramenta no estudo da interação planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 19, n. 1, p. 337-385, dez. 2011.

MAZUR, P. Principles of cryobiology. In: FULLER, B.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Ed.). **Life in the Frozen State**. London: CRC Press, 2004. p. 3–66.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas & Fundação Zoo-Botânica, 2000. 157 p.

MINC, C. **Instrução normativa no 06, de 23 de setembro de 2008**. Normas para comercialização e manejo de sempre vivas. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008.

MOREIRA, F. C. et al. Dehydration and cryopreservation of *Xyris cipoensis* seeds. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1039, n. 1, p. 243-246, July 2014.

MOTA, N. F. O.; WANDERLEY, M. G. L Three new species of *Xyris* (Xyridaceae) from Diamantina Plateau in Brazil, Minas Gerais. **Brittonia**, Bronx, v. 66, n. 1, p. 42–50, Jan. 2014.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M. Determination of the ipê-do-cerrado (*Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl.) seeds humidity degree by the greenhouse and microwave oven methods. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1299-1305, dez. 2004.

NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 84-90, jan./fev. 2003.

ORIANI, A.; SCATENA, V. L Reproductive biology of *Abolboda pulchella* and *A. poarchon* (Xyridaceae: Poales). **Annals of Botany**, London, v. 107, n. 4, p. 611–619, Apr. 2011.

_____. Floral Anatomy of *Xyris* (Poales): Contributions to Their Reproductive Biology, Taxonomy, and Phylogeny. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 173, n. 7, p. 767-779, Sept. 2012.

OZUDOGRU, A. E. et al. *In vitro* conservation and cryopreservation of *Nandina domestica*, an outdoor ornamental shrub. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 638-645, Nov. 2013.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 37, n. 1, p. 32-39, jan./fev. 2013.

PIRANI, A. M.; MENEZES, N. L. Estudos em sempre vivas: importância Econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 179-193, jan. 1988.

PRITCHARD, H. W. Classification of seed storage types for *ex situ* conservation in relation to temperature and moisture. In: GUERRANT, E. O.; KAYRI, H.; MIKE, M. (Ed.). **Ex situ plant conservation**. London: Island Press, 2004. p. 139–161.

PRITCHARD, H. W.; NADARAJAN, J. Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 485–502.

PRITCHARD, H. W.; NADARAJAN, J. Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 485–501.

REMIZOWA, M. V. et al. Flower development and vasculature in *Xyris grandis* (Xyridaceae, Poales); a case study for examining petal diversity in monocot flowers with a double perianth. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 170, n. 1, p. 93–111, Sept. 2012.

SAKAI, A. Survival of the twigs of woody plants at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Nature**, London, v. 185, n. 1, p. 392–394, Feb. 1960.

SILVA, L. C. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* embryos followed by room temperature thawing. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 309-315, July/Sept. 2014.

_____. et al. Shoot-tip cryopreservation by droplet vitrification of *Byrsonima intermedia* a. juss: a woody tropical and medicinal plant species from brazilian cerrado. **Cryoletters**, Kingdom, v. 34, n. 4, p. 338-348, July/Aug. 2013.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Xyridaceae. In: TEIXEIRA, A. R. (Ed.). **Flora brasílica**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1968. p. 1-215.

SOARES, F. P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA_3 e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 1847-1852, mar. 2009.

SOFIATTI, V. et al. Uso do hipoclorito de sódio para degradação do endocarpo de sementes de cafeeiro com diferentes graus de umidade. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 150-160, jan. 2008.

SOUZA, A. C. et al. Dehydration and cryopreservation of handroanthus serratifolius embryos. **Acta Horticulture**, Fort Collins, v. 1039, p. 181-186, Aug. 2014.

SUSZKA, J. et al. Optimal seed water content and storage temperature for preservation of *Populus nigra* L. germplasm. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v. 71, n. 5, p. 543-549, Mar. 2014.

WALTERS, C. et al. Temperature-dependency of molecular mobility in preserved seeds. **Biophysical Journal**, New York, v. 86, n. 2, p. 1253-1258, 2004.

WANG, B. et al. Cryopreservation of potato shoot tips. In: BENKEBLIA, N.; TENNANT, P. (Ed.). **Potato I. Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology**. London: Global Science Book, 2008. p. 46-53.

WANG, Q. Cryopreservation of grapevine (*Vitis spp.*) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p. 267-275, July 2004.

WEN, B. et al. Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, New York, v. 239, n. 1, p. 57-67, Nov. 2010.

CAPÍTULO 4 Desidratação e criopreservação de sementes de *Xyris cipoensis*

RESUMO

Xyris cipoensis (Xyridaceae) é uma espécie herbácea, endêmica e ocorre nos Campos Rupestres brasileiros. Objetivou - se criopreservar as sementes de *Xyris cipoensis*. A hidratação realizada, durante a descontaminação inicial das sementes, reduziu a sobrevivência das amostras criopreservadas. A sobrevivência aumentou quando as sementes foram desidratadas antes da criopreservação. A maior sobrevivência foi observada em sementes desidratadas, durante cinco horas, quando comparadas às amostras não desidratadas controle. Cinco horas de desidratação reduziram a germinação de sementes não expostas ao NL. O estudo demonstra a viabilidade da criopreservação de sementes de *Xyris cipoensis* seguida da germinação *in vitro*.

Palavras-chave: Xyridaceae. Espécie rupestre. Endêmica e ameaçada de extinção. Espécie ornamental. Armazenamento em longo prazo.

ABSTRACT

Xyris cipoensis (Xyridaceae) is an herbaceous species endemic to the Brazilian rupestrian fields. Seeds of this species age rapidly and the seedlings are hard to establish *in vitro* due to early senescence. The objective of this study was to cryopreserve seeds of *Xyris cipoensis*. Initial decontamination treatments hydrated seeds and reduced survival of cryo exposed samples. Survival increased when these seeds were dried prior to cryo-exposure, with seeds dried for 5 h germinating at control levels. Five hours of dehydration appeared to reduce germination of seeds not exposed to LN. The study demonstrates the feasibility of cryopreserving *Xyris cipoensis* seeds and germinating them *in vitro*.

Keywords: Xyridaceae. Wild population. Endemic species rupestrian. Endangered species. Ornamental species. Long term-storage. *Ex situ* conservation.

1 INTRODUÇÃO

Xyridaceae (Poales) é uma família, predominantemente, tropical e subtropical, distribuída em cinco gêneros e, aproximadamente, 415 espécies, popularmente, conhecidas como sempre vivas (CAMPBELL, 2004). As plantas do gênero *Xyris* L. são, amplamente, distribuídas em Campos Rupestres, frequentemente, encontradas no Espinhaço e montanhas da Serra Geral de Goiás no Brasil (GIULIETTI et al., 1988). Atualmente, 15 espécies de *Xyris*, incluindo *Xyris cipoensis*, estão listadas como ameaçadas de extinção (MINC, 2008). A extração excessiva das inflorescências, antes da dispersão de sementes, é a principal responsável pela redução e o isolamento de populações naturais que são pequenas e fragmentadas com o fluxo gênico restrito (GIULIETTI et al., 1988). As espécies da família Xyridaceae ocorrem associadas com espécies pertencentes às famílias Euriocalaceae, Melastomataceae, Cyperaceae e Rapataceae, todas com potencial ornamental e todas são alvo de extrativismo.

Taxonomia, anatomia (CAMPBELL, 2012) e biologia reprodutiva (ORIANI; SCATENA, 2011; REMIZOWA et al., 2012) de Xyridaceae foram, parcialmente, caracterizados, mas há poucos relatos de métodos para promover a conservação *ex situ*, inclusive, para cultura *in vitro* e técnicas de criopreservação (LIMA-BRITO et al., 2011; PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013). A criopreservação é considerada a plataforma mais promissora para a preservação em longo prazo de germoplasma vegetal (CARVALHO; VIDAL, 2003). O armazenamento em ultrabaixa temperatura em nitrogênio líquido (-196°C) reduz drasticamente as reações metabólicas, assegurando a viabilidade em longo prazo (ENGELMANN, 2000, 2011; WANG, 2004).

O grau de umidade das sementes de *X. cipoensis* durante a dispersão é de, aproximadamente, 14%, sugerindo que elas são ortodoxas (ABREU; GARCIA, 2005). As sementes ortodoxas podem permanecer viáveis por longos

períodos, se a umidade e a temperatura são reduzidas. As sementes ortodoxas podem germinar quando as condições ambientais são favoráveis (BEWLEY; BLACK, 1994). Não há relatos sobre a longevidade de sementes de *X. cipoensis* *in situ* (isto é, conservada em banco de sementes) ou em bancos de armazenamento de sementes, sob condições convencionais utilizadas para sementes ortodoxas (ou seja, cerca de 5% de água e -20°C). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi testar a viabilidade de criopreservação de sementes de *Xyris cipoensis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Xyris cipoensis cresce em Campo Rupestre que ocorre em altitudes acima de 900 m, onde os solos têm uma textura arenosa e de baixa fertilidade e a vegetação, geralmente, apresenta crescimento lento (CARVALHO et al., 2012). As inflorescências de *X. cipoensis* foram coletadas, no mês de outubro, em plantas que crescem em locais de campos localizados perto da cidade de Diamantina (18°20'S, 43° 53'W), Minas Gerais, Brasil. As inflorescências foram removidas, manualmente, a partir de plantas parentais, quando as sementes apresentavam a coloração marrom escuro, o que sinaliza que elas estavam prontas para a dispersão e tinham alta viabilidade. As sementes foram descontaminadas em 25 mL de fundo cônico de tubos de plástico estéreis e realizada uma lavagem de 30 segundos em 10 mL de etanol (70%), seguido de cinco minutos de imersão em 10 mL de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) e, em seguida, foram realizadas três lavagens com água esterilizada. Após o processo de assepsia, as sementes foram desidratadas em papel de filtro estéril (9 cm de diâmetro) por 1, 2, 3, 4 e 5 h. Depois de cada tempo de desidratação, três amostras de sementes, pesando cerca de 50 mg (cerca de 800 sementes), foram colocadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido (NL) durante uma semana. As sementes foram descongeladas em banho maria (38 ± 2 °C) durante 60 segundos. As sementes expostas e não expostas ao NL foram inoculadas em meio de plantas lenhosas (WPM) descrito por Loyd e McCown (1980), contendo 15 g L^{-1} sacarose, 7 g L^{-1} de ágar vegetal com pH ajustado para 5,8. As sementes inoculadas foram incubadas a 25 ± 2 °C com 16 horas de luz/8 horas de escuro.

Para cada período de desidratação, 250 sementes foram coletadas aleatoriamente, a partir de três amostras descongeladas e distribuídos entre 50 tubos de ensaio (25 x 150 mm) com cinco sementes por tubo. A porcentagem de sementes germinadas foi avaliada, após 15 dias. A ANOVA foi utilizada para

comparar a resposta de germinação entre (i) o período de desidratação das sementes que foram expostas (+NL) ou não expostas (-NL) ao nitrogênio líquido e (ii) e verificar a presença de interação entre a exposição ao NL e o período de desidratação. As médias de 250 sementes por tratamento foram analisadas com o teste de Tukey ao nível de $p \leq 0,05$ usando o SISVAR software estatístico (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A desidratação inicial pode afetar a viabilidade das sementes de *X. cipoensis* que não foram expostas ao NL. Após 1h de desidratação, 78% das sementes germinaram no tratamento (-LN). Esta elevada taxa de germinação foi mantida durante 4h de desidratação (Fig. 1). Em contraste, a desidratação aumentou a viabilidade das sementes que foram expostas ao LN ($p < 0,0001$). Após 1 h de desidratação, 42% das sementes do tratamento + LN germinaram, mas houve um aumento na germinação para 94% em sementes desidratadas durante 5h (Figura 1).

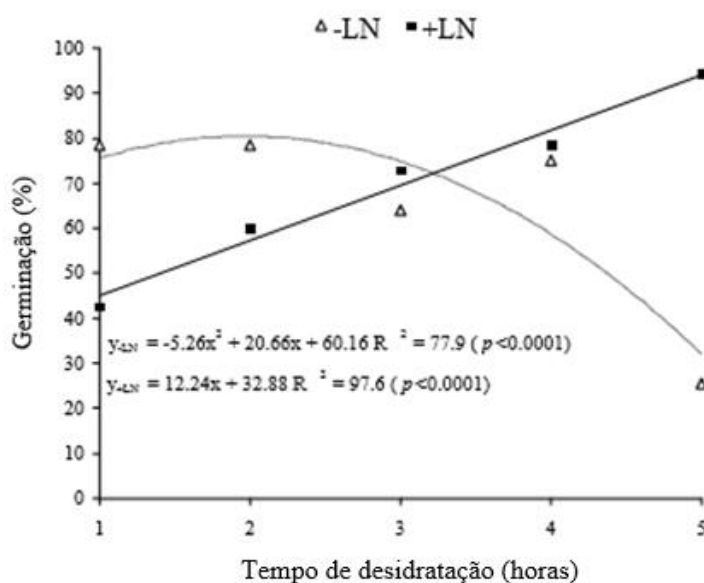


Figura 1 As análises de regressão para as relações entre a (%) de germinação e o tempo de desidratação para as sementes que não foram expostas (-LN) e que foram expostas (+LN) ao nitrogênio líquido. Cada ponto representa a média de 250 sementes. Os modelos de regressão foram usados e uma equação linear simples para os tratamentos +LN e uma equação quadrática para o tratamento -LN

Durante o congelamento e/ou descongelamento, a água intracelular pode formar cristais de gelo, o que geralmente leva à morte celular (MAZUR, 1984). Reduzir o teor de umidade é essencial para prevenir dano durante o congelamento (PANIS; SWENNEN; ENGELMANN, 2001). Observou-se a redução na germinação (para 25,6%) para o tratamento de sementes de *X. cipoensis* desidratadas (-LN) durante 5 h (Figura 1). A menor germinação observada em sementes desidratadas, durante 5 h no tratamento -LN (Figura 1 e 2A), é surpreendente e deve ser investigada para confirmar se esse resultado é repetível. Atualmente, pode-se explicar essa anomalia como a indução da dormência secundária por desidratação, possivelmente, pelo acúmulo do ácido abscísico endógeno (BEARDMORE; WHITTLE, 2005; SCHOLTEN et al., 2009; SHI et al., 2013). A exposição das sementes em NL pode promover a germinação por induzir a síntese de giberelina, naturalmente, que a ação desse hormônio é antagonista para o ácido abscísico, sendo responsável pela quebra da dormência das sementes (VILLIERS; WAREING, 1965; SCHOLTEN et al., 2009).

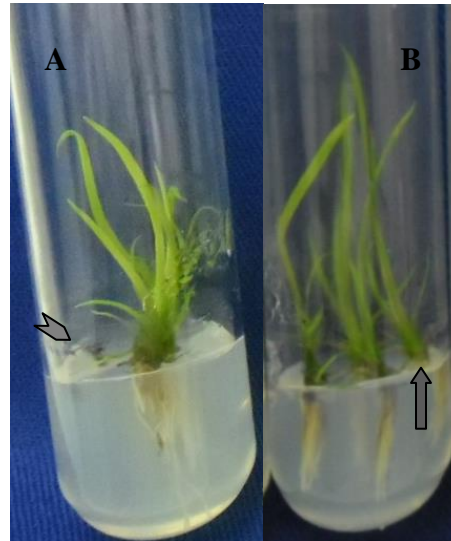


Figura 2 Plântulas de *Xyris cipoensis* obtidas de sementes desidratadas durante 5 h que não foram expostas (-LN) (A) e que foram expostas (+LN) ao nitrogênio líquido (B). Os tubos foram inoculados com cinco sementes cada. As setas indicam plântulas germinadas e as pontas da seta indicam sementes que não germinaram

A menor germinação induzida por desidratação em sementes do tratamento -NL pode, também, ser o resultado de danos da embebição, quando as sementes são, rapidamente, desidratadas e, posteriormente, reidratadas. Os resultados obtidos confirmam a viabilidade de conservação *ex situ* de *Xyris cipoensis* usando a técnica de criopreservação. As sementes que são, superficialmente, esterilizadas devem ser novamente desidratadas antes de serem expostas à criopreservação para obter uma alta germinação pós-descongelamento.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. E. P.; GARCIA, Q. S. Efeito da luz e da temperatura na germinação de Sementes de Quatro Espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae) ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, p. 149-154, ago. 2005.
- BEARDMORE, T.; WHITTLE, C. A. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. **Acta Botanica Brasílica**, Belo Horizonte, v. 25, n. 3, p. 965-972, fev. 2005.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- CAMPBELL, L. M. Pólen morfologia de xyridaceae (poales) e seu potencial sistemática. botânico. **Revisão**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 428-439, jan. 2012.
- CAMPBELL, L. M. Xyridaceae. In: SMITH, N. et al. (Ed.). **Flowering plants of the neotropics**. Princeton: Princeton University Press, 2012.
- CARVALHO, A. F. et al. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 52, p. 9-19, Jan. 2012.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa, 2003. 22 p.
- ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: IPGRI, 2000. p. 8-20.
- _____. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um computador sistema de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 1039-104, jun. 2011.
- GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 1, n. 1, p. 179-193, jan. 1988.

HU, X. W.; HUANG, X. H.; WANG, Y. R. Hormonal and temperature regulation of seed dormancy and germination in *Leymus chinensis*. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 67, n. 1, p. 199-207, Mar. 2012.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul: subsp. mucugensis. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 502-510, maio/jun. 2011.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, n. 1, p. 421-427, Jan. 1980.

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

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **Am. J. American Journal of Physiology- Cell Physiology**, Kingdom, v. 247, n. 3, p. 125-142, Sept. 1984.

MINC, C. **Instrução normativa no 06, de 23 de setembro de 2008**. Normas para comercialização e manejo de sempre vivas. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA signaling in stress-response and seed development. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, n. 1, p. 959-970, Mar. 2013.

ORIANI, A.; SCATENA, V. L Reproductive biology of *Abolboda pulchella* and *A. poarchon* (Xyridaceae: Poales). **Annals of Botany**, London, v. 107, n. 4, p. 611-619, Apr. 2011.

PANIS, B.; SWENNEN, R.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm. **Acta Horticulture**, Bélgica, v. 560, n. 1, p. 79-86, Oct. 2001.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 37, n. 1, p. 32-39, jan./fev. 2013.

REMIZOWA, M. V. et al. Flower development and vasculature in *Xyris grandis* (Xyridaceae, Poales): a case study for examining petal diversity in monocot flowers with a double perianth. **Journal of the Linnean Society**, London, v. 170, n. 1, p. 93-111, Mar. 2012.

SCHOLTEN, M. et al. Environmental regulation of dormancy loss in seeds of *Lomatium dissectum* (Apiaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 7, p. 1091-1101, May 2009.

SHI, H. et al. Arabidopsis altered meristem program 1 negatively modulates plant responses to abscisic acid and dehydration stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 67, n. 1, p. 209-216, Jan. 2013.

VILLIERS, T. A.; WAREING, P. F. The possible role of low temperature in breaking the dormancy of Seeds of *Fraxinus excelsior* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 16, n. 48, p. 519-531, Mar. 1965.

WANG, Q. Cryopreservation of grapevine (*Vitis spp.*) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 3, n. 3, p. 267-227, June 2004.