

AGRÁRIA

Revista Brasileira de Ciências Agrárias

ISSN (on line) 1981-0997

v.7, n.3, p.502-507, jul.-set., 2012

Recife, PE, UFRPE. www.agraria.ufrpe.br

DOI:10.5039/agraria.v7i3a1606

Protocolo 1606 - 29/05/2011 • Aprovado em 17/02/2012

João P. R. Martins¹

Marinês F. Pires¹

Breno R. Santos²

Sandro Barbosa²

Luiz A. Beijo²

Fabricio J. Pereira¹

Alterações na anatomia caulinar de ipê-amarelo em diferentes condições de pré-aclimatização em tubos de ensaios

RESUMO

Estudos referente às modificações estruturais anatômicas decorrentes dos processos de cultivo *in vitro*, permitem compreender seus efeitos, elaborar protocolos mais eficientes e otimizar as técnicas de micropropagação. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência do tipo de vedação e substrato em tubos de ensaios empregados durante a pré-aclimatização na anatomia caulinar de plantas de ipê-amarelo. Plantas previamente estabelecidas *in vitro* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo vedação com algodão, tampa sem e com parafilme e substratos com ágar, vermiculita e Plantmax[®]. Após 45 dias de pré-aclimatização, segmentos internodais de plantas de cada tratamento foram extraídos para confecção de secções transversais caulinares e, para efeito comparativo, o mesmo procedimento foi realizado em plantas *in vivo*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 (tipos de vedação e de substratos) com tratamento adicional (*in vivo*). O uso de algodão ou tampa sem parafilme combinado com ágar durante a pré-aclimatização levou a modificações caulinares que favorecem a aclimatização das plantas de ipê-amarelo.

Palavras-chave: cultura de tecidos, espécie lenhosa, *Handroanthus chrysotrichus*

Changes in stem anatomy of ipê-amarelo under different pre-acclimatization conditions in test tubes

ABSTRACT

Studies on structural changes resulting from *in vitro* culture procedures allow us to understand its effects, develop more efficient protocols and to optimize the micropropagation techniques. Thus the objective was to evaluate the influence of the seal and substrate employed during the pre-acclimatization on stem anatomy of ipê-amarelo plants. Plants previously established *in vitro* were inoculated in test tubes with cotton seal, cover free and with parafilm and substrates with agar, vermiculite and Plantmax[®]. After 45 days of pre-acclimatization, internodal segments of plants of each treatment were extracted for construction of stem cross sections and for comparison the same procedure was carried out in plants *in vivo*. The experiment was conducted in completely randomized 3x3 factorial scheme (three types of sealing and of substrate) with additional treatment (*in vivo*). The use of cotton or cover without parafilm combined with agar during the pre-acclimatization led to stem modifications which favored the acclimatization of ipê-amarelo.

Key words: tissue culture, woody species, *Handroanthus chrysotrichus*

1 Universidade Federal de Lavras,
Departamento de Biologia, Campus
Universitário, CEP: 37.200-000, Lavras -
MG, Brasil. Caixa Postal 3037.

Fone: (35) 3829-1367.

E-mail: jpmartins@yahoo.com.br;

marinespires@gmail.com;

fabriciopereira@dbi.ufla.br

2 Universidade Federal de Alfenas, Instituto de
Ciências da Natureza - ICN, Campus Sede,
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700.

CEP: 37.130-000, Alfenas - MG, Brasil.

Fone: (35) 3299-1419.

E-mail: brenors@yahoo.com.br;

sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br;

luizbeijo@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos) - Bignoniaceae, tem porte arbóreo, com altura média entre 4 e 10 m, distribuição do Nordeste até o Sul do Brasil, considerada uma espécie típica de floresta ombrófila densa e de áreas de mata de galeria no domínio do Cerrado. No Brasil, a espécie *H. chrysotrichus* é amplamente disseminada devido à sua utilização na arborização de ruas e paisagismo de praças, notadamente pelo florescimento intenso, reconhecida como uma das árvores-símbolo do País (Lorenzi & Souza, 2005; Costa et al., 2007), sua madeira é resistente e por isso utilizada na construção civil, além de produzir pigmentos para tingir seda e algodão (Oliveira et al., 2008).

A propagação de muitas espécies desse gênero tem sido realizada principalmente por sementes, que são produzidas em grande quantidade, porém elas têm problemas de germinação e conservação (Oliveira et al., 2005). Ao trabalhar com *H. chrysotrichus*, Oliveira et al. (2008) observaram baixa viabilidade das sementes avaliadas pelo teste de tetrazólio em razão do tempo de armazenamento. Para sementes desta espécie houve grande decréscimo na porcentagem de germinação a partir de 60 dias de armazenamento quando armazenadas em condições naturais (Marques et al., 2004).

A cultura de tecidos é uma das alternativas para a regeneração de plantas que têm dificuldades de reprodução natural ou quando os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (Thorpe et al., 1991). Contudo, estudos anatômicos demonstraram que órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* podem ter estruturas e tecidos pouco desenvolvidos quando comparados com plantas da mesma espécie, cultivadas em casa de vegetação (Louro et al., 2003).

Em todos os tecidos do mesófilo de plantas de ipê-amarelo (*Handroanthus serratifolius*) cultivadas *in vitro*, Dousseau et al. (2008) observaram que os mesmos eram menos espessos em relação às plantas *in vivo*. Essas alterações, induzidas pelo cultivo *in vitro*, podem comprometer a eficiência fotossintética e diminuir a resistência à desidratação, porém foram sanadas, segundo os autores, de forma progressiva, durante a aclimatização, e conferiram, às plantas aclimatizadas, alguns aspectos anatômicos que permitiram o desenvolvimento dos tecidos responsáveis pela fotossíntese e maior capacidade de regulação hídrica.

O conhecimento das alterações anatômicas promovidas durante o cultivo *in vitro* e como essas podem ser sanadas por meio de novas metodologias, é fundamental para o estabelecimento de protocolos eficientes e voltados para a sobrevivência durante a fase de transferência para as condições *ex vitro*.

Desta forma, o objetivo foi avaliar a influência do tipo de vedação e o substrato em tubos de ensaios empregados durante a pré-aclimatização na anatomia caulinar de plantas de ipê-amarelo.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de plantas matrizes *in vitro*

Sementes de *Handroanthus chrysotrichus* coletadas em árvores localizadas na região de Alfenas, MG, foram

desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% (m/v) durante 10 minutos, lavadas três vezes com água destilada esterilizada em autoclave e inoculadas em tubos de ensaio vedados com tampa plástica e parafilme, contendo meio de cultura Wood Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980).

O meio de cultura foi suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH do meio ajustado em 5,8 ± 0,1 antes da esterilização, realizada em autoclave a 120 °C a 1,0 atm, por 20 minutos. A inoculação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar e o material vegetal foi mantido em sala de crescimento sob densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 43 μmol m⁻² s⁻¹ a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, até a execução do procedimento experimental

Uso de diferentes vedações e substratos na pré-aclimatização

Aos 45 dias de cultivo *in vitro*, 135 plantas foram transferidas assepticamente para tubos de ensaio contendo diferentes tipos de vedação (algodão, tampa sem e com parafilme) e diferentes substratos (ágar, vermiculita e Plantmax®, sendo este último um substrato comercial, químico, físico, biologicamente estabilizado e pronto para uso) acrescidos com solução do meio Wood Plant Medium, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 10,0 mg L⁻¹ de ácido cítrico e 30,0 g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,2 antes da esterilização em autoclave a 120 °C e 1,0 atm por 20 minutos; após a inoculação as plantas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente.

Análise anatômica e estatística

Após 45 dias de pré-aclimatização quatro plantas de cada tratamento foram selecionadas aleatoriamente, das quais foram extraídos segmentos internodais entre o primeiro e segundo nós do caule, a partir da região do coleto e fixados em solução de FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 70% na proporção de 0,5:0,5:9) durante 48 horas só então conservados em etanol 70% (Johansen, 1940). Para efeito comparativo, segmentos internodais de plantas *in vivo* de ipê-amarelo do município de Alfenas, MG, foram coletados e submetidos aos mesmos procedimentos de microtécnica vegetal.

Os cortes transversais foram realizados a mão livre, com auxílio de lâmina de aço e clarificados com hipoclorito de sódio 1% (m/v), cujos cortes foram corados com solução de azul de astra (0,1%) e safranina (1%), na proporção de 7:3 (Bukatsch, 1972), sendo utilizada glicerina a 50% para montagem das lâminas as quais foram observadas em microscópio óptico Carl Zeiss Microimaging GmbH Scope.A1 acoplado à câmera digital. As secções foram digitalizadas e posteriormente utilizadas para as medições das características anatômicas através do software UTHSCSA-Imagetool® calibrado com régua microscópica digitalizada nos mesmos aumentos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 (tipos de vedação e de substratos) com tratamento adicional (*in vivo*) contendo quatro plantas para cada um, das quais foram realizados dois cortes histológicos.

As características anatômicas analisadas foram: espessura da epiderme, colênquima, floema e das fibras extraxilemáticas,

tal como o diâmetro das células do parênquima cortical, de metaxilema e do parênquima medular, sendo todos os resultados expressos em μm .

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas com auxílio do pacote ExpDes do software R 2.13.1 (Ferreira et al., 2011) utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se, de acordo com a análise de variância, diferença significativa entre os tratamentos de pré-aclimatização para todas as características anatômicas de *H. chrysotrichus*. Quando se compararam os tratamentos de pré-aclimatização com as plantas *in vivo*, apenas a espessura do colênquima e o diâmetro das células do parênquima medular não diferiram significativamente (Tabela 1).

Entre os tratamentos de pré-aclimatização apenas o diâmetro das células do metaxilema e do parênquima medular foram influenciados por um fator (substrato) sendo que para as demais variáveis, constatou-se interação significativa entre tipo de vedação e substrato (Tabela 1 e Figura 1A-I).

As diferenças significativas verificadas entre as plantas em pré-aclimatização *in vitro* e coletadas *in vivo*, foram na espessura da epiderme, diâmetro das células do parênquima cortical, espessura das fibras extraxilemáticas internas e diâmetro das células do metaxilema (Tabela 2 e Figura 1A-H).

Em plantas de *Tabebuia serratifolia* submetidas às condições *in vitro* foram constatadas alterações morfo-anatômicas que reduziram a capacidade de sobrevivência após a transferência para o ambiente *ex vitro*, tornando-se fundamental a avaliação da mudança estrutural durante o processo de adaptação (Dousseau et al., 2008). Nas plantas de ipê-branco (*Tabebuia rosea alba*) cultivadas *ex vitro* a espessura do limbo foliar, nervura central da epiderme adaxial e abaxial e os parênquimas paliádico e esponjoso, eram maiores, características essas que as tornam mais adaptadas contra dessecação em relação às plantas obtidas *in vitro* (Abbade et al., 2009).

Entre os tratamentos de pré-aclimatização para a epiderme, os resultados foram semelhantes entre si para o substrato vermiculita, independentemente da vedação empregada; o mesmo foi averiguado para algodão e tampa com parafilme dentro de cada nível de substrato; apenas as combinações de tampa sem parafilme com ágar ou Plantmax® foram superiores às dos demais tratamentos para epiderme (Tabela 3).

A epiderme fornece proteção mecânica e está relacionada com a restrição da transpiração da parte aérea na fase de crescimento primário (Carvalho & Pires, 2008); desta forma, as plantas em fase de pré-aclimatização demonstraram melhores condições quando cultivadas em ágar ou Plantmax® com tampa sem parafilme (Figura 1A e 1G). A maior espessura da epiderme permite o desenvolvimento de uma barreira para a transpiração (Castro et al., 2009) o que possibilita, às plantas de ipê-amarelo, permanecerem hidratadas ao longo da pré-aclimatização e aclimatização, reduzindo sua mortalidade.

Nas plantas *in vivo* foram observados os menores valores para a espessura da epiderme quando comparadas com as plantas em pré-aclimatização (Tabela 2 e Figura 1A-H) devido, provavelmente, ao início do desenvolvimento da estrutura secundária de crescimento, a periderme, o que também foi observado por Ginzberg et al. (2009).

Nas células do parênquima cortical os maiores valores ocorreram nas plantas cultivadas em ágar combinado com tampa sem parafilme, em relação aos demais tratamentos (Tabela 3). Segundo Hoffmann et al. (2001) a utilização de ágar como substrato permite maior facilidade de acesso aos nutrientes e, em consequência, água, em relação ao Plantmax® e vermiculita. Maior disponibilidade de água no substrato pode afetar o córtex caulinar das plantas, produzindo células corticais com maiores diâmetros e porcentagem de espaços intercelulares (Medri et al., 2007).

No sistema de sustentação a espessura do colênquima foi maior nos tratamentos com melhor aeração (algodão e tampa sem parafilme) quando combinados com os substratos ágar ou vermiculita. Resultados semelhantes foram observados nas fibras extraxilemáticas internas que estavam mais espessas quando se empregou ágar em conjunto com a vedação algodão ou tampa sem parafilme (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 1. Resumo da ANOVA para as características anatômicas do caule de plantas de ipê-amarelo cultivadas em pré-aclimatização e *in vivo*

Table 1. Summary of ANOVA for the anatomical characteristics of stem of plants of ipê-amarelo grown under pre-acclimatization and *in vivo*

Fontes de variação	Quadrado médio das variáveis						
	EP	DPC	COL	FB	FL	MXL	DPM
Substrato	1,50 ^{ns}	356,30*	433,00*	598,35*	409,61*	46,18*	458,79*
Vedação	54,40*	75,83*	445,19*	134,33 ^{ns}	1287,88*	4,90 ^{ns}	107,35 ^{ns}
Substrato (Sub) x Vedação (Ved)	51,86*	591,11*	162,87*	156,15*	751,72*	6,89 ^{ns}	33,46 ^{ns}
<i>In vivo</i> x Fatorial (Sub x Ved)	191,19*	3263,45*	130,68 ^{ns}	955,79*	12514,75*	171,71*	113,20 ^{ns}
Resíduo	8,19	28,95	42,49	46,36	76,87	8,73	36,74

* Significativas pelo teste F a nível de 5%, ^{ns} não significativo pelo teste F a nível de 5%. Espessura da epiderme (EP), diâmetro das células do parênquima cortical (DPC), espessura do colênquima (COL), espessura das fibras extraxilemáticas internas (FB), espessura do floema (FL), diâmetro das células do metaxilema (MXL) e diâmetro das células do parênquima medular (DPM)

Tabela 2. Características anatômicas do caule das plantas cultivadas em pré-aclimatização e *in vivo*; as medidas estão em μm

Table 2. Anatomical characteristics of stems of plants grown in pre-acclimatization and *in vivo*; measurements are in μm

Tratamentos	EP	DPC	COL	FB	FL	MXL	DPM
<i>In vivo</i>	10,86b	13,51b	34,03a	44,23a	83,93a	15,97a	28,90a
Pré-aclimatização	16,01a	34,80a	29,78a	32,72b	42,25b	11,10b	32,87a

Espessura da epiderme (EP), diâmetro das células do parênquima cortical (DPC), espessura do colênquima (COL), espessura das fibras extraxilemáticas internas (FB), espessura do floema (FL), diâmetro das células do metaxilema (MXL), diâmetro das células do parênquima medular (DPM). Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5%

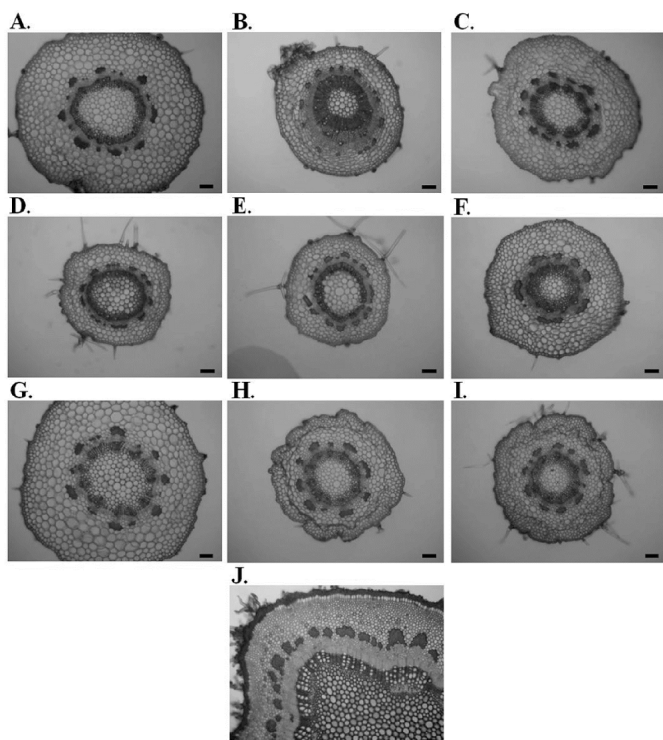


Figura 1. Secções transversais de caule de plantas de ipê-amarelo em diferentes condições de pré-aclimatização, em condições de cultivo *in vitro* e *in vivo*. A = plantas em pré-aclimatização com ágar + tampa sem parafilme; B = plantas em pré-aclimatização com ágar + algodão; C = plantas em pré-aclimatização com ágar + tampa com parafilme; D = plantas em pré-aclimatização com vermiculita + tampa sem parafilme; E = plantas em pré-aclimatização com vermiculita + algodão; F = plantas em pré-aclimatização com vermiculita + tampa com parafilme; G = plantas em pré-aclimatização com Plantmax® + tampa sem parafilme; H = plantas em pré-aclimatização com Plantmax® + algodão; I = plantas em pré-aclimatização com Plantmax® + tampa com parafilme e J = plantas *in vivo*. Barras = 100 µm

Figure 1. Transverse sections of stems of ipê-amarelo plants under different conditions of pre-acclimatization, under conditions of *in vitro* and *in vivo*. A = plants in pre-acclimatization with agar+cover without parafilm, B = plants in pre-acclimatization with agar+cotton, C = plants in pre-acclimatization with agar+cover with parafilm, D = plants in pre-acclimatization with vermiculite+cover without parafilm, E = plants in pre-acclimatization with vermiculite+cotton, F = plants in pre-acclimatization with vermiculite+cover with parafilm, G = plants in pre-acclimatization with Plantmax®+cover without parafilm, H = plants in pre-acclimatization with Plantmax®+cotton, I = plants in pre-acclimatization with Plantmax®+cover with parafilm, J = plants *in vivo*. Bar = 100 µm

A vermiculita oferece maior espaço de aeração entre as partículas do substrato em comparação com o Plantmax®, característica esta que, combinada com as vedações tampa sem parafilme e algodão, proporciona boa aeração no ambiente *in vitro* (Lima et al., 2007; Santana et al., 2008). De acordo com Damiani & Schuch (2009) o aumento das trocas gasosas com o uso de um sistema de vedação mais permeável a gases atua de forma positiva no desenvolvimento dos tecidos da planta devido à redução do efeito tóxico provocado pelo acúmulo de etileno nos frascos de cultivo.

A maior aeração combinada com a disponibilidade de nutrientes e de água oferecida pelo ágar (Hoffmann et al., 2001) pode explicar, sem dúvida, o maior espessamento dos tecidos de sustentação, uma vez que estas células possuem quantidades

Tabela 3. Características anatômicas do caule de plantas de ipê-amarelo cultivadas em pré-aclimatização por 45 dias, em função da vedação e do substrato

Table 3. Anatomical characteristics of stem of plants of ipê-amarelo grown under pre-acclimatization for 45 days due to the seal and the substrate

Substrato	Vedação	EP DPC COL FB FL				
		(µm)				
Ágar	Algodão	14,9B	35,2B	33,7B	40,3A	56,5A
	Tampa sem parafilme	20,0A	49,1A	43,4A	43,9A	45,5A
	Tampa com parafilme	13,9B	31,1B	26,6C	31,0B	28,7B
Plantmax®	Algodão	14,0B	30,0A	23,0A	31,7A	29,6B
	Tampa sem parafilme	19,0A	33,0A	30,6A	29,1A	47,5A
	Tampa com parafilme	14,8B	29,4A	28,1A	26,7A	35,8B
Vermiculita	Algodão	16,6A	35,4A	28,4A	31,4A	53,6A
	Tampa sem parafilme	14,2A	35,9A	29,4A	27,9A	46,1B
	Tampa com parafilme	16,5A	34,1A	24,3A	32,3A	36,9C
Ágar		14,9a	35,2a	33,7a	40,3a	56,5a
Plantmax®	Algodão	14,0a	30,0a	23,0a	31,7b	29,6b
Vermiculita		16,7a	35,4a	28,4a	31,4b	53,6a
Ágar		20,0a	49,1a	43,4a	43,9a	45,5a
Plantmax®	Tampa sem parafilme	19,0a	33,0b	30,6b	29,1b	47,5a
Vermiculita		14,2b	35,9b	29,4b	27,9b	46,1a
Ágar		13,9a	31,1a	26,6 ^b	31,0a	28,7a
Plantmax®	Tampa com parafilme	14,8a	29,4a	28,1a	26,7a	35,8a
Vermiculita		16,5a	34,1a	24,3 ^a	32,3a	36,9a

Espessura da epiderme (EP), diâmetro das células do parênquima cortical (DPC), espessura do colênquima (COL), espessura das fibras extraxilemáticas internas (FB) e espessura do floema (FL). Médias seguidas de mesma letra nas colunas (maiúsculas para o desdobramento de vedação em cada nível de substrato e minúsculas para o desdobramento de substrato em cada nível de vedação) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5%

relevantes de substâncias pécicas com propriedades hidrófilas (Castro et al., 2009).

As fibras extraxilemáticas internas, pertencentes ao esclerênquima e o colênquima, são componentes importantes do sistema de sustentação das plantas (Gondim et al., 2008; Abbade et al., 2009), o que faz o emprego do ágar combinado com tampa sem parafilme ou algodão promissores para o desenvolvimento desses tecidos pois, nessas condições, os tecidos de sustentação tiveram os melhores resultados.

Nos tratamentos de vedação com tampa parafilme foram observados os menores valores nos tecidos de sustentação analisados (Tabela 3) característica esta desfavorável, haja vista que o sistema de sustentação é extremamente significativo para o estabelecimento das plantas, já que permite a aquisição de melhores condições de radiação no ambiente natural, por manter a arquitetura das plantas.

As plantas desenvolvidas em frascos hermeticamente vedados são, geralmente, pouco lignificadas, com células de parede pouco espessas e reduzida quantidade de tecidos de sustentação, além de ocorrer o acúmulo de níveis internos de etileno (Park et al., 2004; Santana et al., 2008).

No sistema vascular observou-se que o floema tinha diferença significativa apenas para a vedação com algodão, sendo maior nos tratamentos consorciados com ágar e vermiculita. No desdobramento do fator substrato em cada nível de vedação constatou-se, em todos os tratamentos, decréscimo na espessura desse tecido com o uso da tampa com parafilme (Tabela 3).

Como um dos principais problemas para as plantas micropropagadas é o desenvolvimento correto dos tecidos vasculares devido à baixa transpiração, o tratamento com ágar mais algodão promoveu o desenvolvimento dos tecidos, de forma funcional e semelhante às plantas *in vivo*, por propiciar maior troca gasosa. De acordo com Mills et al. (2004) ambientes

com maior transpiração favorecem um desenvolvimento melhor do sistema vascular.

Os valores do diâmetro das células do metaxilema foram superiores quando se empregou ágar em relação aos substratos Plantmax® e vermiculita, independente do tipo de vedação usada (Tabela 4).

Tabela 4. Características anatômicas do caule de plantas de ipê-amarelo cultivadas em pré-aclimatização, por 45 dias, em função do substrato

Table 4. Anatomical characteristics of stems of plants of ipê-amarelo grown under pre-acclimatization for 45 days depending on the substrate

Substrato	MXL	DPM
	(µm)	
Ágar	12,7 a	29,5 b
Plantmax®	10,5 b	31,2 b
Vermiculita	10,1 b	37,8 a

Diâmetro das células do metaxilema (MXL), diâmetro das células do parênquima medular (DPM). Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5%

O metaxilema possui importante papel no transporte de água e nutrientes na planta e, segundo Vasellati et al. (2001) neste tecido pode haver alterações em ambientes com alta disponibilidade de água sendo que o ágar permite, quando usado como substrato, maior disponibilidade de nutrientes e água as plantas (Hoffmann et al., 2001), o que está de acordo com os resultados obtidos.

Nas plantas *in vivo* observou-se que o tecido xilemático produzido pelo câmbio vascular foi na forma de um anel contínuo (Figura 1J); contudo, no ambiente *in vitro*, o xilema pode ocorrer de forma fragmentada. Nas vedações com tampa mais parafilme observou-se que o xilema e o floema seguem este padrão, demonstrando que ocorre um desenvolvimento mais lento da estrutura secundária nessas plantas (Figuras 1C, 1F e 1I).

O diâmetro das células do parênquima medular foi modificado apenas pelo tipo de substrato, sendo maior quando se utilizou a vermiculita (Tabela 4) que oferece maior aeração quando comparada ao Plantmax® (Lima et al., 2007) ou a meios de cultivo solidificados com ágar (Leite et al., 1992).

CONCLUSÕES

Os diferentes substratos e vedações promovem diferenças nas condições de desenvolvimento das plantas de ipê-amarelo cultivadas *in vitro*.

As vedações com algodão ou tampa sem parafilme promovem, quando combinadas com o substrato ágar, o desenvolvimento dos tecidos de sustentação e a condução, potencialmente favoráveis à acclimatização das plantas de ipê-amarelo.

LITERATURA CITADA

Abbade, L.C.; Paiva, P.D.O.; Paiva, R.; Castro, E.M.; Centofante, A.R.; Oliveira, C. Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.) - Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v.31, n.3, p.307-311, 2009. <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/1937>>. 16 Mai. 2011. doi:10.4025/actascibiols.v31i3.1937

Bukatsch, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. Mikrokosmos, v.61, n.8, p.255-256, 1972.

Carvalho, G.G.P.; Pires, A.J.V. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. Archivos de Zootecnia, v.57, n.1, p.13-28, 2008. <http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/20_12_06_893ROrganizacaoCarvalho.pdf>. 05 Mai. 2011.

Castro, E.M.; Pereira, F.J.; Paiva, R. Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos. 1.ed. Lavras: Editora UFLA, 2009. v.1, 234p.

Ferreira, E.B.; Cavalcanti, P.P. Nogueira, D.A. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. Revista de Estatística da UFOP, v.1, p.1-9, 2011. <<http://www.rest.ufop.br/2011/C1.pdf>>. 22 Dez. 2011.

Costa, R.B.; Roa, R.A.R.; Xavier, T.M.; Flores, H.C.G. Desenvolvimento inicial de progênies de ipê amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A. DC.) Standl.) no município de Campo Grande, MS, Brasil. Ensaios e Ciência, v.11, n.2, p.39-45, 2007.

Damiani, C.R.; Schuch, M.W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. Ciência Rural, v.39, n.4, p.1012-1017, 2009. <<http://sare.anhanguera.com/index.php/renc/article/view/723/552>>. 30 Abr. 2011.

Dousseau, S.; Alvarenga, A.A.; Castro, E.M.; Soares, P.S.; Emrich, E.B.; Melo, L.A. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a acclimatização. Ciência e Agrotecnologia, v.32, n.6, p.1694-1700, 2008. <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v32n6/v32n6a02.pdf>>. doi:10.1590/S1413-70542008000600002.

Ginzberg, I.; Barel, G.; Ophir, R.; Tzin, E.; Tanami, Z.; Muddarangappa, T.; Jong, T.; Fogelman, E. Transcriptomic profiling of heat-stress response in potato periderm. Journal of Experimental Botany, v.60, n.15, p.4411-4421, 2009. <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/60/15/4411.full>>. 11 Abr. 2011. doi:10.1093/jxb/erp281.

Gondim, A.R.O.; Puiatti, M.; Ventrella, M.C.; Cecon, P.R. Plasticidade anatômica da folha de taro cultivado sob diferentes condições de sombreamento. Bragantia, v.67, n.4, p.1037-1045, 2008. <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v67n4/28.pdf>>. 22 Abr. 2011. doi:10.1590/S0006-87052008000400028.

Hoffmann, A.; Pasqual, M.; Chalfun, N.N.J.; Vieira, S.S.N. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.36, n.11, p.1371-1379, 2001. <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v36n11/6810.pdf>>. 05 Mai. 2011. doi:10.1590/S0100-204X2001001100007.

Johansen, D.A. Plant microtechnique. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

Leite, D.L.; Peters, J.A.; Nakasu, B.H. Micropropagação de pereira (*Pyrus* spp.) cultivar Carrick. Revista Brasileira de Fruticultura, v.14, n.1, p.149-154, 1992.

Lima, Y.O.U.; Ritter, M.; Alcântara, G.B.; Lima, D.M.; Fogaça, L.A.; Quoirin, M.; Cuquel, F.L.; Biasi, L.A. Tipos de estacas e substratos no enraizamento de jambolão. Scientia Agraria, v.8, n.4, p.449-453, 2007. <<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2908635>>. 16 Abr. 2011.

- Lloyd, G.; McCown, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. HortScience, v.15, n.3, p.416-417, 1980.
- Lorenzi, H.; Souza, C.V. Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificar das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005. p.432.
- Louro, R.P.; Santiago, L.J.M.; Santos, A.V.; Machado, R.D. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* plants cultivated *ex vitro* in greenhouse and field conditions. Trees, v.17, n.1, p.11-22, 2003. <<http://www.springerlink.com/content/tytpp6gvkntpwewu/fulltext.pdf>>. 06 Abr. 2011. doi:10.1007/s00468-002-0200-8.
- Marques, M.A.; Rodrigues, T.J.D.; Valeri, S.V.; Malheiros, E.B. Comportamento germinativo de sementes de ipê amarelo [*Tabebuia chrysotricha* (Mart.) Standl.] secadas em câmara seca, armazenadas em diferentes ambientes e submetidas a sete níveis de potencial osmótico. Científica, v.32, n.2, p.127-133, 2004. <<http://www.cientifica.org.br/index.php/cientifica/article/view/77/60>>. 17 Abr. 2011.
- Medri, M.E.; Ferreira, A.C.; Kolb, R.M.; Bianchini, E.; Pimenta, J.A.; Davanso-Fabro, G.M.; Medri, C. Alterações morfoanatômicas em plantas de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. submetidas ao alagamento. Acta Scientiarum - Biological Sciences, v.29, n.1, p.15-22, 2007. <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/408/246>>. 11 Mai. 2011. doi:10.4025/actascibiols.v29i1.408.
- Mills, D.; Yanqing, Z.; Benzioni, A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. *In vitro* Cell Developmental Biological Plant, v.40, n.4, p.396-402, 2004. <<http://www.jstor.org/stable/4293760>>. 11 Mai. 2011.
- Oliveira, A.K.M.; Scheleder, L.J.D.; Favero, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex. DC.) Standl. Revista Árvore, v.32, n.6, p.1011-1018, 2008. <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v32n6/a06v32n6.pdf>>. 15 Mai. 2011. doi:10.1590/S0100-67622008000600006.
- Oliveira, L.M.; Carvalho, M.L.M.; Silva, T.T.A.; Borges, D.I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. - Bignoniaceae. Ciência e Agrotecnologia, v.29, n.3, p.642-648, 2005. <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v29n3/a20.pdf>>. 22 Abr. 2011. doi:10.1590/S1413-70542005000300020.
- Park, S.W.; Jeon, J.H.; Kim, H.S.; Park, Y.M.; Aswath, C.; Joung, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. Scientia Horticulturae, v.99, n.2, p.199-205, 2004. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423803000979>>. 11 Mai. 2011. doi:10.1016/S0304-4238(03)00097-9.
- Santana, J.R.F.; Paiva, R.; Pereira, F.D.; Oliveira, L.M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. Ciência e Agrotecnologia, v.32, n.1, p.80-86, 2008. <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v32n1/a12v32n1.pdf>>. 18 Jan. 2011. doi:10.1590/S1413-70542008000100012.
- Thorpe, T.A.; Harry, I.S.; Kumar, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. Micropropagation: technology and Application. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p.311-336.
- Vasellati, V.; Oesterheld, M.; Medan, D.; Loreti, J. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. Annals of Botany, v.88, n.3, p.355-360, 2001. 21 Mai. 2011. <<http://aob.oxfordjournals.org/content/88/3/355.full>>. doi:10.1006/anbo.2001.1469.