

**POTENCIAL EMBRIOGÊNICO E  
ORGANOGENICO EM EXPLANTES DE IPÊ-  
BRANCO**

**JORGE MARCELO PADOVANI PORTO**

**2009**

**JORGE MARCELO PADOVANI PORTO**

**POTENCIAL EMBRIOGÊNICO E ORGANOGÊNICO EM  
EXPLANTES DE IPÊ-BRANCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Porto, Jorge Marcelo Padovani.

Potencial embriogênico e organogênico em explantes de ipê-branco / Jorge Marcelo Padovani Porto. – Lavras : UFLA, 2009.  
74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Bibliografia.

1. *Tabebuia roseo-alba*. 2. Embriogênese somática. 3. Organogênese indireta. 4. Aclimatização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.5404165

**JORGE MARCELO PADOVANI PORTO**

**POTENCIAL EMBRIOGÊNICO E ORGANOGÊNICO EM EXPLANTES  
DE IPÊ-BRANCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 20 de fevereiro de 2009

Dra. Fernanda Pereira Soares

MAPA

Profa. Dra. Raírys Cravo Nogueira

UFPA

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

UFLA

(Orientadora)

Lavras

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus e aos meus amados pais, Jorge Porto e Antônia Aparecida  
Padovani Porto

## **OFEREÇO**

A minha família,  
Ao meu irmão, Rodrigo,  
A minha prima-irmã, Marcela,  
A minha amiga Franciane,  
À família Meireles, que me acolheu com carinho,

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge Porto e Antônia Aparecida Padovani Porto cujo amor e incentivo proporcionaram todas as minhas realizações.

A toda minha família que sempre me apoiou.

A família Meireles: Cida, Edmundo, Alex e, principalmente à Eliza, por todo o carinho, ajuda e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, Professora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, por seu auxílio e por me transmitir calma nos momentos difíceis.

Ao Professor Renato Paiva, pela oportunidade de trabalhar no laboratório, antes de iniciar o curso de pós-graduação.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Fernanda Pereira Soares e Professora Dra. Raírys Cravo Nogueira.

Ao Professor Evaristo Mauro de Castro, pela disponibilidade do Laboratório de Anatomia Vegetal.

Ao Professor Eduardo Alves, pela disponibilidade do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da UFLA e a Elô, por toda ajuda.

A todos os professores da UFLA, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Tina, Diogo, Vanessa, Milene, Cristiano, Gabriela, Luciano, Lenaldo, Diogo,

Stephânia, Máisa, Thaís, Lígia, Douglas, Cleílton, Fernanda Soares pela colaboração e amizade.

Ao meu grande amigo Alvinho, responsável pela minha inclusão no mestrado.

À amiga Franciane, por sua constante ajuda, desde a graduação.

Aos funcionários técnico-administrativos: Joel, Lena, Tina, Celen, Barrinha e Odorêncio, pelo auxílio e amizade.

Aos meus amigos Anderson, Emily e Thiago pelos ótimos momentos que vivenciamos juntos.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!!!

## **BIOGRAFIA**

Jorge Marcelo Padovani Porto, filho de Jorge Porto e Antônia Aparecida Padovani, nasceu em Varginha, Minas Gerais, em 27 de março de 1982. cursou o ensino fundamental na Escola Cooperativa Gralha Azul (Lavras-MG) e o médio, na Escola Estadual João Batista Hermeto (Lavras-MG), concluindo-o em 1999. Em 2000, foi aprovado no vestibular para o curso de Ciências Biológicas-Licenciatura do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS), concluído em 2003. No ano de 2006, foi bolsista de apoio técnico pelo CNPq no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA) sob a orientação do Prof. Renato Paiva. Em março de 2007, iniciou o mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal na UFLA, sob a orientação da Prof. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, concluindo-o em fevereiro de 2009.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO GERAL .....   | i  |
| GENERAL ABSTRACT .....   | ii |
| CAPÍTULO 1 Introdução Geral .....  | 1  |
| 1 Introdução .....   | 2  |
| 2 Referencial teórico .....  | 3  |
| 2.1 Descrição e importância da espécie .....   | 3  |
| 2.2 Propagação do ipê-branco .....   | 4  |
| 2.3 Embriogênese somática .....  | 6  |
| 2.4 Organogênese indireta .....  | 8  |
| 2.5 Aclimatização .....  | 9  |
| 3 Referências Bibliográficas .....   | 10 |
| CAPÍTULO 2 Indução de calos embriogênicos em ipê-branco .....  | 16 |
| Resumo .....   | 17 |
| Abstract .....   | 18 |
| 1 Introdução .....   | 19 |
| 2 Material e métodos .....   | 21 |
| 2.1 Indução de calos embriogênicos a partir de folha cotiledonar, hipocótilo<br>e raiz de ipê-branco ..... | 21 |
| 2.2 Análise ultra-estrutural de calos de ipê-branco .....  | 22 |
| 2.3 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans .....   | 23 |
| 3 Resultados e Discussão .....   | 24 |
| 3.1 Indução de calos embriogênicos a partir de folha cotiledonar,<br>hipocótilo e raiz de ipê-branco ..... | 24 |
| 3.2 Análise ultra-estrutural de calos de ipê-branco .....  | 28 |
| 3.3 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans .....   | 29 |
| 4 Conclusões .....   | 31 |

|   |    |
|---|----|
| 5 Referências Bibliográficas .....  | 32 |
| CAPÍTULO 3 Indução de calos organogênicos em ipê-branco .....                 | 37 |
| Resumo .....  | 38 |
| Abstract .....  | 39 |
| 1 Introdução .....  | 40 |
| 2 Material e Métodos .....  | 41 |
| 2.1 Indução de calos organogênicos em ipê-branco .....                        | 41 |
| 3 Resultados e Discussão .....  | 43 |
| 3.1 Indução de calos organogênicos em ipê-branco .....                        | 43 |
| 4 Conclusões .....  | 46 |
| 5 Referências bibliográficas .....  | 46 |
| CAPÍTULO 4 Aclimatização de plântulas de ipê-branco .....                     | 49 |
| Resumo .....  | 50 |
| Abstract .....  | 51 |
| 1 Introdução .....  | 52 |
| 2 Material e Métodos .....  | 53 |
| 2.1 Aclimatização de plântulas de ipê-branco germinadas <i>in vitro</i> ..... | 53 |
| 2.2 Análises anatômicas .....   | 54 |
| 3 Resultados e Discussão .....  | 55 |
| 3.1 Aclimatização de plântulas de ipê-branco germinadas <i>in vitro</i> ..... | 55 |
| 3.2 Análises anatômicas .....   | 58 |
| 3.2.1 Seções paradérmicas .....   | 58 |
| 3.2.2 Seções transversais .....   | 61 |
| 4 Conclusões .....  | 65 |
| 5 Referências Bibliográficas .....  | 66 |
| ANEXOS .....  | 70 |

## RESUMO GERAL

PORTO, Jorge Marcelo Padovani. **Potencial embriogênico e organogênico em diferentes explantes de ipê-branco**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

As sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.) perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas, mantendo-se por cerca de quatro meses. O presente estudo teve por objetivo propor metodologias para o cultivo *in vitro* do ipê-branco, por meio da indução de embriogênese somática, organogênese indireta e, ainda, avaliar a aclimatização das plântulas. Os explantes constituíram-se de segmentos de folhas cotiledonares, de hipocótilos e de raízes retirados de plântulas de ipê-branco germinadas *in vitro*. Foram testados o efeito do 2,4-D, do ANA e do Picloram nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L<sup>-1</sup> acrescidas no meio de cultura MS para a indução de embriogênese somática. Para a indução de organogênese indireta, além dos explantes já citados, utilizou-se também segmentos de cotilédones imaturos, dispostos em meio MS acrescidos de cinetina e TDZ nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Plântulas produzidas *in vitro* por meio de germinação de sementes foram aclimatizadas nos substratos, Plantmax, vermiculita, areia e a combinação desses três. Os resultados indicaram que o meio de cultura MS suplementado com 4 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionou a indução de calos com características embriogênicas em explantes radiculares, hipocotilares e nas folhas cotiledonares. Na análise ultra-estrutural dos calos com características embriogênicas, verificou-se que as células possuem formato isodiamétrico semelhantes a embriões somáticos em estágio globular. Na análise citoquímica, pôde-se confirmar a presença de células pró-embriogênicas na massa de calos, ocorrendo em maior porcentagem (46%) em calos induzidos a partir de segmentos de folhas cotiledonares. Para o estudo de organogênese indireta, os resultados mostraram que o maior número de brotações foi observado na concentração de 2,27 mg L<sup>-1</sup> de TDZ. Observou-se 100 % de sobrevivência das plântulas no processo de aclimatização. A densidade estomática, o diâmetro polar e equatorial das plântulas *in vitro* foram maiores em relação às aclimatizadas. Ao contrário, a relação DP/DE foi menor para as folhas em ambiente *in vitro*. O mesófilo e as epidermes adaxial e abaxial se apresentaram menores no ambiente *in vitro*.

Palavras-chave: *Tabebuia roseo-alba*; embriogênese somática; organogênese indireta; aclimatização

---

\***Comitê Orientador:** Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, DAG - UFLA (Orientadora); Renato Paiva, DBI – UFLA (Co-orientador).

## GENERAL ABSTRACT

PORTO, Jorge Marcelo Padovani. **Embryogenic and organogenic potential of ‘ipê-branco’ explants**. 2009. 74 p. Dissertation (Master in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG. \*

*Tabebuia roseo-alba* (‘ipê-branco’) seeds quickly lose their viability when stored. It is possible to store them for about four months. Nevertheless, the germination percentage is very low, around 40%. The current study aimed to propose methodologies for *in vitro* cultivation of *Tabebuia roseo-alba*. The technologies used were the induction of somatic embryogenesis and indirect organogenesis. We also evaluate the seedlings acclimatization. The explants used were cotyledonary leaves, hypocotyls and roots segments. These explants were obtained from *Tabebuia roseo-alba* seedlings *in vitro* germinated. For the somatic embryogenesis experiment, the effect of 2,4-D, NAA and picloram on MS medium was evaluated. The concentrations used were 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; and 4,0 mg L<sup>-1</sup>. For the induction of indirect organogenesis, in addition to the above explants, cotyledons were also used. For this experiment, MS medium was supplemented with kinetin and TDZ in the same concentrations used in the first experiment. Seedlings obtained by *in vitro* seeds germination were acclimatized in the Plantmax<sup>®</sup> substrate, vermiculite, sand, and in their mixture. The results showed that MS culture medium added with 4 mg L<sup>-1</sup> NAA promoted callus induction with embryogenic characteristics in roots, hypocotyls and cotyledonary leaves. The ultra-structural analysis of these callus showed cells with isodiametric format. This format is similar to somatic embryos in globular stage. Through the cytochemistry analysis was possible to confirm the presence of pre-embryogenic cells. The highest percentage (46%) of this mass callus was obtained using cotyledonary leaves. For the indirect organogenesis, the results showed that the largest shoots number was observed using 2,27 mg L<sup>-1</sup> TDZ. It was observed 100% survival of the acclimatized seedlings. It was observed anatomic differences between the leaves from *in vitro* seedlings and ones that were acclimatized. The *in vitro* leaves were higher in size, stomatal density and equatorial and polar diameter than that ones were acclimatized. On the other hand, leaves from *in vitro* culture presented PD/ED relation, mesophyll and adaxial and abaxial epidermis smaller than the acclimatized leaves.

Keywords: *Tabebuia roseo-alba*; somatic embryogenesis; indirect organogenesis; acclimatization

---

\***Guidance Committe:** Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, DAG - UFLA (Adviser); Renato Paiva, DBI – UFLA (Co-adviser).

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

O ipê-branco é uma árvore nativa de ampla ocorrência em todo o território brasileiro. Em função de seu florescimento exuberante e de características arbóreas desejáveis, é de grande importância para o paisagismo, particularmente para a arborização de ruas, avenidas e, inclusive, para o reflorestamento em terrenos secos e pedregosos (Lorenzi, 2000).

Várias espécies do gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae) são nativas do Brasil e vulgarmente denominadas de ipê. O nome vulgar de cada espécie é complementado pela coloração das flores, que pode ser branca, amarela, rosa ou roxa (Ferretti et al., 1995). Dentre as espécies mais cultivadas desse gênero, *T. roseo-alba* (Ridl.) Sand. é a única que produz flores brancas (Maeda & Matthes, 1984). Apesar da importância do gênero *Tabebuia* no contexto nacional, o alto grau de desmatamento e destruição de áreas florestais, seja pela expansão das fronteiras agrícolas, construção de rodovias ou exploração indevida têm levado à diminuição das populações e à destruição das árvores deste gênero, incluindo o ipê-branco (Oliveira, 2004).

O ipê-branco, apesar de sua floração abundante, produz poucas sementes e muitas não são viáveis. Mello & Eira (1995) obtiveram germinação máxima para sementes de ipê-branco variando de 50 a 60% e, em teste realizado em casa de vegetação, Abadde (2008) observou 50% de germinação. Esses resultados estão de acordo com o relato de que as sementes de ipê-branco têm baixa porcentagem de germinação, mas, em geral, superior a 40% Lorenzi (2000).

Recentemente, trabalhos *in vitro* foram realizados com ipê-branco. Abadde (2008) induziu calos em explantes foliares com diferentes reguladores de crescimento, além de realizar estudos anatômico de folhas de ipê-branco germinadas *in vitro* e *ex vitro*.

Dando continuidade a essas pesquisas, esse estudo teve como propósito verificar o efeito de reguladores de crescimento na indução de embriogênese somática e organogênese indireta em ipê-branco e ainda a aclimatização de plântulas produzidas *in vitro*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Descrição e importância da espécie

Conhecida popularmente como ipê-branco, a espécie *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand. é nativa do Brasil, ocorrendo espontaneamente no norte do estado de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás. Nos locais de ocorrência natural, ocupa tanto o interior da mata primária como as formações secundárias. Também é esparsamente encontrada na caatinga do nordeste brasileiro. A planta alcança entre 7 e 16 metros de altura, apresenta copa alongada e caule ereto, entre 40 e 50 cm de diâmetro, com casca suberosa e superficialmente fissurada. Possui folhas compostas trifoliadas e folíolos levemente pubescentes em ambas as faces. A floração ocorre principalmente nos meses de agosto a outubro, com a planta totalmente despida da folhagem e seus frutos amadurecem a partir de outubro (Lorenzi, 2000).

Em função do florescimento exuberante e da folhagem densa de cor verde azulada e forma piramidal da copa, a espécie é de grande importância para o paisagismo, particularmente na arborização de ruas e avenidas (Figura 1).

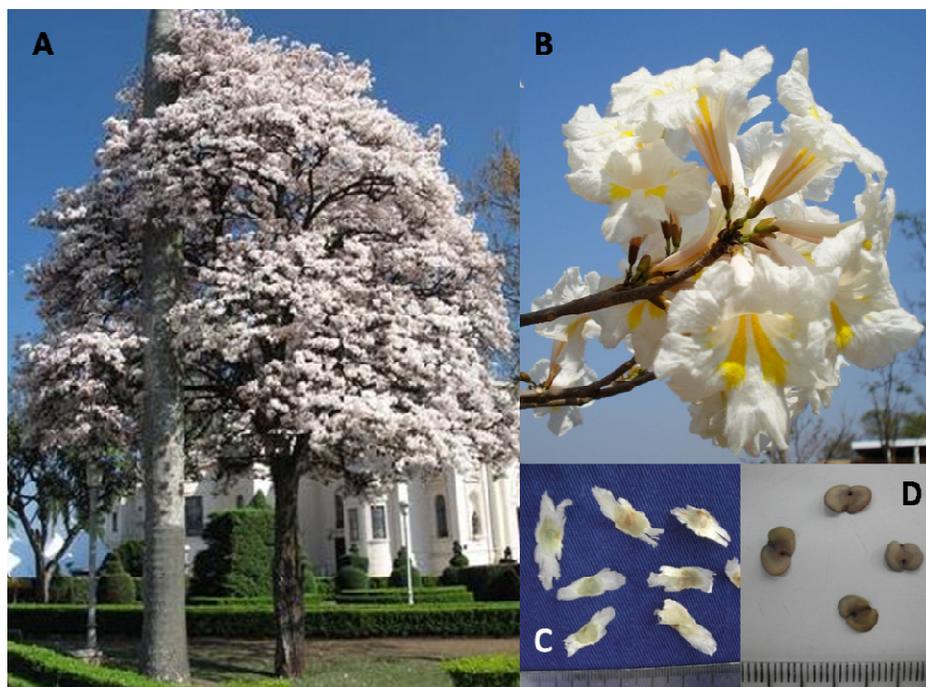


FIGURA 1 Aspecto visual de uma planta de ipê-branco adulta (A), da inflorescência (B), de sementes com o tegumento alado (C) e de sementes sem o tegumento (D).

O ipê-branco é utilizado também para reflorestamentos em terrenos secos e pedregosos devido a sua adaptação a esses ambientes. A madeira pode ser utilizada na construção civil (Lorenzi, 2000).

## 2.2 Propagação do ipê-branco

A propagação convencional é feita essencialmente por meio de sementes e, segundo Gurgel Filho & Pasztor (1963), a germinação do ipê-branco ocorre rapidamente, no período de 10 dias, em condições de campo.

De acordo com Kageyama & Marques (1981), espécies do gênero *Tabebuia* são pioneiras e apresentam mecanismos adaptáveis que favorecem a dispersão das sementes e o seu rápido estabelecimento. Assim, possuindo

pequenas quantidades de reserva que implicam um período curto de viabilidade das sementes. Quando armazenadas, as sementes também perdem a viabilidade rapidamente, mantendo-se por cerca de quatro meses (Lorenzi, 2000; Cabral et al., 2003).

Abbade (2008) obteve porcentagem de 50% de germinação de sementes em substratos constituídos por terra + areia ou apenas plantmax®. No entanto, embora rápida, a porcentagem de germinação das sementes é baixa. Assim, com o intuito de ampliar essa taxa de germinação, essa autora utilizou técnicas de cultura de tecidos para a germinação *in vitro*, utilizando o meio MS adicionado de 3mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, ou adicionado de 1mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> no meio MS com 50% de concentração de sais, obtendo 88 e 80% de germinação, respectivamente.

Técnicas de cultura de tecidos são indicadas para determinadas espécies quando suas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelas vias convencionais. Como exemplo, podem ser citadas, espécies que apresentam pequeno período de armazenamento e baixa viabilidade de sementes, conforme verificado para o ipê-branco.

Existem várias técnicas de cultivo *in vitro*, podendo-se induzir a produção de plântulas por via direta, pelo desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante, ou indiretamente, via cultura de calos. Os calos formados podem ser submetidos a determinadas condições -- utilizando reguladores de crescimento -- as quais podem direcioná-los para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, por embriogênese ou organogênese (Caldas, 1996). Através da técnica de cultura de tecidos, Abbade (2008) induziu a formação de calos a partir de segmentos foliares de ipê-branco utilizando diferentes reguladores de crescimento acrescidos ao meio de cultura, indicando a possibilidade de propagação de ipê-branco a partir da organogênese indireta ou da embriogênese somática.

Para as espécies lenhosas, a micropropagação apresenta algumas limitações que dificultam seu uso, como a grande variabilidade genética existente em plantas nativas e a maior dificuldade de crescimento e diferenciação dos seus tecidos *in vitro* (Coelho, 1999). Para superar esses obstáculos, é necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências de cada espécie (Decceti, 2000).

### **2.3 Embriogênese somática**

A embriogênese somática consiste no processo no qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se diretamente a partir de um tecido vegetal, ou de calos, formando estruturas semelhantes ao embrião zigótico e, posteriormente, originam uma planta, sem que ocorra fusão de gametas (Thorpe, 1995; Guerra et al., 1999).

De acordo com Torres et al. (1999), a formação de embriões somáticos foi observada pela primeira vez por Steward (1958) e logo depois por Reinert (1959), em cultura de calos de cenoura. Desde então, este processo tem sido considerado importante, tanto como via de regeneração de plantas *in vitro* quanto como modelo para estudos básicos relacionados à fisiologia e morfogênese do embrião de plantas (Zimmerman, 1993; Yeung, 1999).

Segundo Haccius (1978), os embriões somáticos passam pelos seguintes estádios de desenvolvimento embrionário: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, semelhantes ao padrão de desenvolvimento do embrião zigótico. Além disso, o embrião somático caracteriza-se por apresentar bipolaridade, constituída de ápice caulinar e radicular, além de um sistema vascular fechado sem conexão com os tecidos do explante inicial.

Os embriões somáticos *in vitro* podem ser formados a partir de embriogênese direta ou indireta, sendo a via indireta o processo mais comum. De acordo com Sharp (1980), a embriogênese somática direta ocorre a partir do

explante, o qual possui células programadas para diferenciação (“Pré Embryogenic Determined Cells” – PEDC) e formação dos embriões somáticos. No processo de embriogênese somática indireta, a formação dos embriões somáticos envolve a desdiferenciação celular, proliferação de calos e a diferenciação de células embriogênicas (“Induced Embryogenic Determined Cells” – IEDC).

As células embriogênicas pré-determinadas (PEDCs) necessitam de pequena indução exógena por meio de reguladores de crescimento para a indução de divisão celular e expressão da embriogênese pois, sendo pré-determinadas, sua exposição a reguladores de crescimento permite a ocorrência do processo de embriogênese. As células induzidas à determinação embriogênica (IEDCs) necessitam da ação de reguladores de crescimento para reiniciar o processo de mitose e determinar o estado embriogênico dos calos (Sharp, 1980; Gosal et al., 1995).

Características morfológicas de células embriogênicas são observadas pela análise ultra-estrutural, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Esta análise tem sido descrita em estudos de embriogênese somática para diferentes espécies, como *Theobroma grandiflorum* (Ferreira et al., 2005) e *Byrsonima intermedia* (Nogueira et al., 2007).

Além das características morfológicas, as células embriogênicas reagem fortemente ao corante carmim acético. Em estudos citoquímicos, o carmim acético é utilizado para detectar glicoproteínas, cromatina e DNA (Gupta & Durzan, 1987), macromoléculas abundantes nas células embriogênicas. Neste sentido, avaliações histológicas são úteis para caracterizar a ontogenia dos embriões, verificar a origem dos mesmos, a presença de embriogênese repetitiva e as possíveis causas da falta de conversão dos embriões em plântulas. Análises histológicas têm sido descritas para muitas espécies, como em *Carthamus*

(Mandal et al., 1995), *Prunus* (Garin et al., 1997), *Glehnia* (Hirai et al., 1997), *Pinus* (Häggman et al., 1999), e *Medicago* (Monteiro et al., 2003).

Apesar dos avanços verificados no estudo da embriogênese somática, ainda é limitada a compreensão dos estímulos e condições necessárias para a indução e controle desse processo. A utilização do processo de embriogênese somática para fins tecnológicos depende do domínio preciso da fisiologia do seu desenvolvimento (Guerra et al., 1999).

#### **2.4 Organogênese indireta**

A organogênese *in vitro* é um processo no qual células e tecidos são induzidos a mudanças que levam à formação de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo, cujo sistema vascular está freqüentemente conectado ao tecido de origem. Pode ocorrer diretamente, a partir de células do explante original ou, indiretamente, via formação de calos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Esse processo pode ser influenciado por diversos fatores, como genótipo, composição do meio de cultura, ambiente, tempo (período de sub-cultivo) e interações entre e dentro dos fatores acima mencionados (Mc Cown & Sellmer, 1987). Baseando-se nesses conceitos, a formação de brotos em cultura *in vitro* vem sendo obtida a partir de diversos tipos de explantes, como segmento nodal e internodal (Herve et al., 2001; Rahim et al., 2003), discos foliares (Subbaiah & Minocha, 1990; Laine & David, 1994; Barrueto Cid et al., 1999; Herve et al., 2001;), segmentos cotiledonares (Dibax, 2005) e hipocotiledonares (Azmi et al., 1997).

Em geral, são reconhecidas três fases da organogênese indireta, sendo essas com base no requerimento temporal de um balanço específico de fitohormônios para o controle da organogênese. Na primeira fase, as células dos explantes adquirem competência, que é definida como a habilidade de responder

a sinais hormonais de indução de órgãos. O processo da competência para a organogênese indireta é referido como “desdiferenciação”, em que as células dos explantes cultivados são estimuladas para a formação de um órgão específico sob a influência do balanço de fitohormônios durante a segunda fase. Então, a morfogênese ocorre independentemente das fontes exógenas de fitohormônios durante a terceira fase (Sugiyama, 1999).

O processo organogênico depende da aplicação de reguladores de crescimento, em particular auxinas e citocininas e, também, da habilidade do tecido em responder ao estímulo durante a cultura. Desse modo, a natureza manipulável da cultura de tecidos pode ser explorada para o melhor entendimento do processo fisiológico que resulta na organogênese *in vitro* (Christianson & Warnick, 1985; Lo et al., 1997).

## **2.5 Aclimatização**

A aclimatização pode ser definida como a transferência da planta da condição *in vitro* para o ambiente natural ou para um ambiente intermediário, como casa de vegetação ou telado (Debergh & Maene, 1981). A maioria das espécies que crescem *in vitro* requerem um processo de aclimatização para sobreviver e crescer quando transferidas para o solo (Preece & Sutter, 1991) e um grande número de plantas pode não sobreviver a esse processo.

A principal causa da baixa sobrevivência é a excessiva perda de água pelas plantas durante a aclimatização (Sutter & Lamghans, 1982). Alguns dos fatores responsáveis por essa perda de água são a quantidade reduzida de cera epicuticular, que deixa as taxas de transpiração mais altas em folhas de plantas com baixa quantidade de cera epicuticular cultivadas *in vitro*, quando comparadas com as plantas que cresceram em casa de vegetação (Wardle et al., 1983). Da mesma forma, os mecanismos de abertura e fechamento de estômatos das plantas cultivadas *in vitro* e em processo de aclimatização são mais lentos do

que em plantas mantidas em casa de vegetação ou já aclimatizadas, o que pode levar à rápida perda de água, causando degradação nas folhas e resultando em clorose. A baixa integridade da cutícula e da membrana celular também contribui para a degradação dos estômatos (Sutter, 1988).

Vários fatores são limitantes para a fase de aclimatização, como a passagem de um baixo fluxo respiratório (*in vitro*) para um ambiente que demanda incremento na taxa de respiração, podendo causar estresse hídrico e a passagem de um meio heterotrófico com grande suprimento de energia para o autotrófico, com a necessidade de realizar fotossíntese para sobrevivência. A planta necessita incrementar a absorção de sais mais rapidamente e ainda fica sujeita ao ataque de microorganismos (Grattapaglia & Machado, 1998).

### 3 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. 2008. 113p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRÉ, P.; PROTEAU, M.; BOUDET, A. M.; CHRIQUI, D. High frequency plant regenerants from *Eucalyptus globulus* labill hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 9-16, Oct. 1997.

BARRUETO CID, L. P.; MACHADO, A. C. M. G.; CAVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 17-23, Jan. 1999.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. e Hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 609-617, out./dez. 2003.

CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo, RJ. **Anais...** Nova Friburgo, RJ: SBB, 1996. p. 22.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNCK, D. A. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. **Developmental Biology**, San Diego, v. 112, n. 2, p. 494-497, Dec.1985.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. ]**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DECCEI, S.F.C. **Propagação *in vitro* de *Annona glara* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 335-345, Apr. 1981.

DIBAX, R.; EISFELD, C. de L.; CUQUEL, F. L.; KOEHLER, H.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptuscamaldulensis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 406-412, July/Aug. 2005.

FERREIRA, M. das G. R.; CARVALHO, C. H. S. de; CARNEIRO, A. de A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.

FERRETTI, A. R.; KAGEYAMA, P. Y.; ÁRBOCZ, G. de F.; SANTOS, J. dos; BARROS, M. I. A. de; LORZA, R. F.; OLIVEIRA, C. de. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 3, n. 7, p. 73-77, mar./jun.1995.

GARIN, E.; GRENIER, E.; GRENIER-DE MARCH, G. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 83-91, Feb.1997.

GOSAL, S. S.; GILL, M. I. S.; GREWAL, H. S. Somatic embryogenesis in citrus species. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Ed). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. v. 2, p.1-21.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUERRA, P. M.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Produção de Informação/ Embrapa Hortaliças, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. **Bio/technology**, New York, v. 5, n. 2, p. 147-151, 1987.

GURGEL FILHO, O. A.; PASZTOR, Y. P. C. Fenologia e comportamento em alfobre de espécies florestais e ornamentais. **Silvicultura**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 291-304, dez. 1963.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus culture. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 28, p. 74-81, 1978.

HÄGGMAN, H.; JOKELA, A.; KRAJNAKOVA, J.; KAUPPI, A.; NIEMI, K.; ARONEN, T. Somatic embryogenesis of Scot pine: cold treatment and characteristics of explant affeting induction. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 341, p. 1769-1778, Dec. 1999.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 4, p. 645-653, Sept. 2001.

HIRAI, G.; KASAI, N.; HARADA, T. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryo culture of *Glehnia littoralis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 175-180, Feb. 1997.

KAGEYAMA, P. Y.; MARQUEZ, F. C. M. Comportamento de sementes de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial: gênero *Tabebuia*, **Publicación Especial Instituto Nacional de Investigaciones Florestales**, México, v. 35, p. 347-352, 1981.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, n. 8, p. 473-476, May 1994.

LO, K. H.; GILES, K. L.; SAWHANEY, V. K. Acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha* x *confuse* hybrids (African violet) cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 6, p. 416-420, Mar. 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, p. 53.

MAEDA, J. A.; MATTHES, L. A. F. Conservação de sementes de ipê. **Bragantia**, Campinas, v. 43, n. 1, p. 51-61, 1984.

MANDAL, A. K. A.; CHATTERJI, A. K.; DUTTA GUPTA, S. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledonary leaves of safflower. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, n. 3, p. 287-289, Sept. 1995.

MCCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for wood plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 4-13.

MELLO, C. M. C.; EIRA, M. T. S. Conservação de sementes de ipês (*Tabebuia* spp.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 19, n. 4, p. 427-432, 1995.

MONTEIRO, M.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VALARINI, M. J.; OLIVEIRA, C. A. de; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplasts of alfafa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 683-689, Oct./Dec. 2003.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl.2, p. 48-50, jul. 2007.

OLIVEIRA, L. M. **Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius Ex A. P. De Candolle Standley) envelhecidas natural e artificialmente.** 2004. 160 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application.** Dodrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.

RAHIM, F.; JABEEN, M.; ILAHI, I. Mass propagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 2, p. 184-187, 2003.

REINERT, J. Über die kontrolle der morphogenese und die induction von adventivembryonen an gewebeculturen auskarroten. **Planta**, Heidelberg, Berlin, v. 53, n. 4, p. 318-333, May 1959.

SHARP, W. R. The physiology of in vitro assexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.

STEWART, F. C., MAPES, M. O., MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells: II. organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 45, p. 705-708, 1958.

SUBBIAIAH, M. M.; MINOCHA, S. C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, n. 7, p. 370-373, Nov. 1990.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, n. 1, p. 61-64, Apr. 1999.

SUTTER, E.; LANGHANS, R. W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, n. 12, p. 2896-2902, Dec. 1982.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal *in vitro* culture. **Journal of the American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Mar 1988.

THORPE, T. A. ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 558 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Produção de informação/ Embrapa Hortaliças, 1999. v. 1, p. 509.

WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K C. *In vitro* acclimatization of aseptically culture plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 386-389, May 1983.

YEUNG, E. C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems: some practical comments. **In Vitro Cell Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 35, n. 2, p. 137-143, Mar. 1999.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, Oct. 1993.

## **CAPÍTULO 2**

### **INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM IPÊ-BRANCO**

## RESUMO

O ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.) possui rápida perda da viabilidade das sementes e sua germinação é muito baixa, de aproximadamente 40%. Alguns estudos já foram realizados, induzindo calos em explantes foliares. O presente estudo teve por objetivo estudar a indução de calos embriogênicos, visando à posterior regeneração de plantas como uma alternativa para a produção de mudas de ipê-branco. Foram utilizados como explante segmentos de folhas cotiledonares, de hipocótilos e de raízes provenientes de plântulas de ipê-branco com 20 dias de germinação *in vitro*. Os diferentes explantes foram inoculados em meio MS suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e diferentes auxinas. Estudou-se o efeito do 2,4-D, Picloram e ANA nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Foram realizadas análises ultra-estruturais por meio de microscopia de varredura e análises citoquímicas, por meio de teste com carmim, para os calos com características embriogênicas provenientes dos diferentes explantes. Os resultados indicaram que o meio de cultura suplementado com 4 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionou a indução de calos com características embriogênicas em explantes radiculares, hipocotilares e de folhas cotiledonares, sendo para o último, a maior porcentagem (70 % dos explantes). O uso de 2,4-D e Picloram foi eficiente para a formação de calos nos diferentes explantes, mas não foram verificadas características embriogênicas. Na análise ultra-estrutural dos calos com características embriogênicas, verificou-se que as células das diferentes fontes de explantes possuem formato isodiamétrico semelhantes a embriões somáticos em estágio globular e na análise citoquímica, pôde-se confirmar a presença na massa de calo de células pró-embriogênicas. Calos induzidos a partir de segmentos de folhas cotiledonares tiveram 46% de reação positiva ao corante carmim.

Palavras-chave: *Tabebuia roseo-alba*; calos embriogênicos; ANA

## ABSTRACT

Seeds from *Tabebuia roseo-alba* ('ipê-branco') lost their viability very fast. Besides, seeds germination is very low, reaching approximately 40%. This study aimed the *in vitro* induction of embryogenic callus. This technology allows subsequent plants regeneration as an alternative for the 'ipê-branco' seedlings production. Seeds were *in vitro* germinated and after 20 days, cotyledonary leaves, hypocotyls and roots segments excised from these seedlings were used as explants. They were inoculated on MS medium supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), agar (5.0 g L<sup>-1</sup>) and different auxins. The effect of 2,4-D, picloram and NAA at concentrations 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L<sup>-1</sup> was evaluated. For the callus analysis with embryogenic characteristics was performed ultra-structural study by scanning electron microscopy and cytochemical test with carmine. The results showed that the culture medium supplemented with 4 mg L<sup>-1</sup> NAA presented induction of callus with embryogenic characteristics in all explants used. However, cotyledonary leaves presented the highest percentage (70% of explants of embryogenic characteristics). The use of 2,4-D and picloram was efficient for callus formation in different explants, but were not observed embryogenic characteristics. In the ultra-structural analysis of callus with embryogenic characteristics it was found that cells from different explants sources had isodiametric format. This format is similar to somatic embryos in globular stage. The cytochemical analysis allowed confirming the presence of pro-embryogenic cells in callus mass. Callus induced from cotyledonary leaves presented 46% positive reaction to the dye carmine.

Keywords: *Tabebuia roseo-alba*; embryogenic callus; NAA

## 1 INTRODUÇÃO

As sementes do gênero *Tabebuia* perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas, mantendo-se por cerca de quatro meses (Cabral et al., 2003). Lorenzi (2000) também relata que sua germinação é muito baixa, de aproximadamente de 40%.

Técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido de grande utilidade para a propagação de várias espécies e, dentre elas, a embriogênese somática é uma alternativa à propagação sexuada. Essa técnica possibilita a produção de elevado número de propágulos em curto espaço de tempo, além de contornar problemas inerentes à sementes, como a baixa viabilidade.

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando embriões que darão origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Esta técnica apresenta grande potencial, entretanto, o seu sucesso em plantas lenhosas ainda é incipiente (Guerra et al., 1999).

Em geral, os explantes jovens oriundos de estruturas reprodutivas, como embriões imaturos (Lamb et al., 2002), cotilédones (Rout & Das, 1994), inflorescências (Teixeira & Marbach, 2003) e hipocótilos (Sun et al., 2003) são os mais responsivos. No entanto, outros tecidos também podem ser utilizados como explantes na embriogênese, como ápices caulinares (Chee & Cantliffe, 1992), folhas (Ruffoni et al., 1990) e raízes (Wu et al., 2004; Iancheva et al., 2005; Park et al., 2005). É importante ressaltar que o estágio de desenvolvimento e o estado fisiológico dos tecidos presentes nos explantes são aspectos importantes. Em um determinado genótipo, a sensibilidade das células dos explantes aos fitoreguladores explica o fato de que alguns explantes sejam competentes para a embriogênese e outros não (Guerra et al., 1999; Jiménez, 2001; 2005).

Meios de cultura contendo altas concentrações de sais, como o MS, são os mais indicados para a formação de embriões somáticos (Thorpe, 1995). A formação de embriões somáticos varia de acordo com o tipo, concentração e tempo de exposição aos fitoreguladores. Dentre os fitoreguladores, as auxinas desempenham o papel mais importante na indução da embriogênese somática (Zimmerman, 1993), pois são indicadas como responsáveis pelo estabelecimento da polaridade celular, essencial para a formação dos embriões (Thorpe, 1995). A auxina mais utilizada na indução de embriões somáticos é o 2,4 diclorofenoxiacético seguido pelo ácido naftaleno acético e ácido indolacético (Raemakers et al., 1995, Hirai et al., 1997).

Características morfológicas de células embriogênicas são observadas pela análise ultra-estrutural, por meio de microscopia eletrônica de varredura, como descrito para *Theobroma grandiflorum* (Ferreira et al., 2005) e *Byrsonima intermedia* (Nogueira et al., 2007). Além das características morfológicas, as células embriogênicas reagem fortemente ao corante carmim acético em estudos citoquímicos, como relatado em *Prunus* (Garin et al., 1997), *Pinus* (Häggman et al., 1999) e *Medicago* (Monteiro et al., 2003).

Abadde (2008) observou a formação de calos em segmentos foliares de ipê-branco utilizando diferentes reguladores de crescimento, mas não foi relatado a formação de embriogênese somática.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar a indução de calos embriogênicos em ipê-branco, avaliando diferentes tipos de explantes iniciais e o efeito de diferentes reguladores de crescimento acrescidos ao meio de cultura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Indução de calos embriogênicos a partir de folhas cotiledonares, hipocótilos e raízes de ipê-branco

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Como material vegetal, foram utilizadas folhas cotiledonares, hipocótilos e raízes obtidas de plântulas de ipê-branco. Para esse processo, foram utilizadas sementes cedidas pela CEMIG – Lavras/MG, as quais foram levadas para câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% (v/v) por 20 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 20 minutos e, posteriormente, lavadas três vezes com água destilada e autoclavada, para o processo de desinfestação. Posteriormente, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (23 x 137 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3,0 %) e ágar (0,5 %), acrescidos de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, (Abbade, 2008). O pH dos meios foi ajustado para 5,8, sendo posteriormente autoclavado a uma temperatura de 121° C e a 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a 25 ± 2°C.

Depois de germinadas (20 dias), realizou-se a extração dos explantes. As folhas cotiledonares foram excisadas com diâmetro médio de 1 cm e os hipocótilos e raízes, com 1 cm de comprimento. Posteriormente, foram inoculados em tubos de ensaio (23 x 137 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3,0 %) e ágar (0,5 %). Ao meio de cultura, foram acrescentados os reguladores de crescimento Picloram, ácido naftalenoacético

(ANA), ou 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg L<sup>-1</sup> e, ainda, um tratamento controle, sem a adição de regulador de crescimento. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e realizou-se autoclavagem a uma temperatura de 121° C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram transferidos para sala de crescimento, onde foram mantidos na ausência de luz e em temperatura de 25 ± 2°C. A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação, observando-se a porcentagem de formação de calos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio, com um explante. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão no programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

## **2.2 Análise ultra-estrutural de calos de ipê-branco**

Para a realização de análise ultra-estrutural dos calos, objetivando observar se as células possuíam características embriogênicas, induziu-se calos nos explantes folhas cotiledonares, hipocótilos e raízes detidas de plântulas de ipê-branco após 20 dias de germinação *in vitro* e inoculados em meio de cultura MS suplementado com 4 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Após 30 dias, coletaram-se as amostras constituídas de calos com características embriogênicas, as quais foram imersas em solução fixadora Karnovsky (pH 7,2) por um período de 24 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,056 M (três vezes por um período de 10 minutos cada e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 4 horas em temperatura ambiente.

Após este período, foram lavadas por 3 vezes em água destilada e, em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), por 10 minutos e três vezes com 100%, por 10 minutos cada.

Após a desidratação, para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico CDP 030, por meio de CO<sub>2</sub> líquido e, então, montadas em *stubs* para metalização com ouro. Os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de varredura (LEO Evo 040), operando entre 10 e 20 kV, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

### **2.3 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans**

Para a realização do teste de carmim visando à confirmação de que se haveria células pró-embriogênicas nos calos, induziu-se calos utilizando-se como explantes folhas cotiledonares, hipocótilos e raízes de plântulas de *Tabebuia roseo-alba* com 20 dias de germinação *in vitro*, inoculados em meio de cultura MS suplementado com 4 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Após 30 dias de cultivo, coletaram-se as amostras constituídas de 100 mg de calos, as quais foram adicionadas de 3 a 5 gotas de corante azul de Evans (0,1%) (peso/volume) por 2 a 3 minutos em uma lâmina.

Após este período, retirou-se o excesso do azul de Evans e adicionou-se de 3 a 5 gotas de corante carmim (2 %) (peso/volume) pelo mesmo período de tempo. Retirou-se o excesso do corante, adicionando-se, em seguida, uma a duas gotas de glicerina. As amostras foram cobertas com uma lamínula, submetendo-se as lâminas prontas a leves batidas com um bastão de vidro, para espalhar o material. A seguir, as amostras foram fotografadas em microscópio de luz em um aumento de 10 vezes e analisados por meio do Software Image Tool<sup>®</sup>.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de regressão, utilizando-se o teste de Scott-Knott, considerando significância de 5% no programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Indução de calos embriogênicos a partir de folhas cotiledonares, hipocótilos e raízes de ipê-branco**

Não houve formação de calos em nenhum dos três explantes testados quando não foram acrescentados reguladores de crescimento no meio de cultura MS. O uso dos reguladores de crescimento 2,4-D e Picloram não foram eficientes para a indução de calos embriogênicos para os diferentes explantes testados. Pôde-se verificar, após 30 dias, apenas a formação de calos compactos nos explantes de ipê-branco. Ao contrário, Abbade (2008) não verificou a indução de calos em folhas de ipê-branco ao utilizar somente 2,4-D no meio de cultura. Observaram-se variações (Tabela 1A) comparando-se as diferentes concentrações utilizadas nos três reguladores de crescimento testados, com a maior porcentagem de calos formados na superfície das folhas cotiledonares para 2,39 mg L<sup>-1</sup> de Picloram (Figura 2).

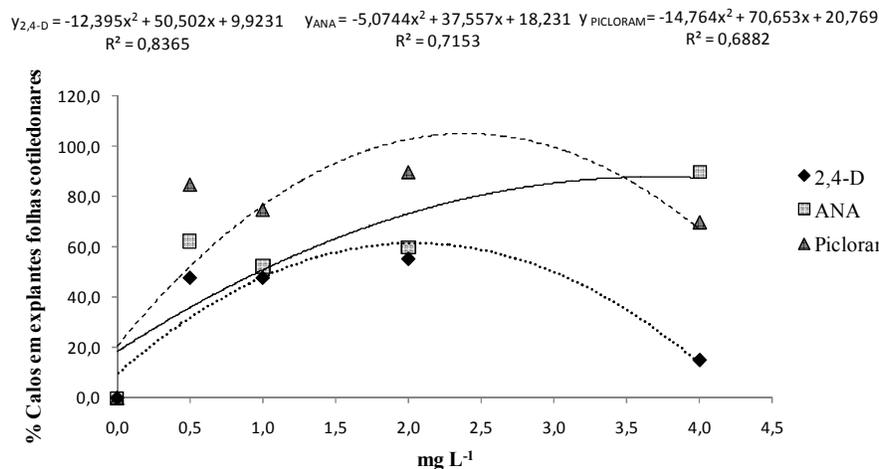


FIGURA 2 Formação de calos em segmentos de folhas cotiledonares de ipê-branco cultivados em meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e Picloram.

Entre os tratamentos utilizados para a formação de calos nos hipocótilos, houve diferença estatística (Tabela 2A), sendo que a maior formação de calos na superfície do explante foi proporcionada pela concentração de 2,51 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (Figura 3). Almeida et al. (2001) trabalhando com o mamoeiro (*Carica papaya*) “Tainung 01” e utilizando diversos tipos de explantes e diferentes meios de cultivo obtiveram respostas variadas em relação à porcentagem de indução de calos, observando uma maior indução e desenvolvimento de calos quando, sob condições de escuro, o hipocótilo com folhas cotiledonares em meio de cultura 50% MS suplementado com 10 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D durante 20 dias foi utilizado como explante.

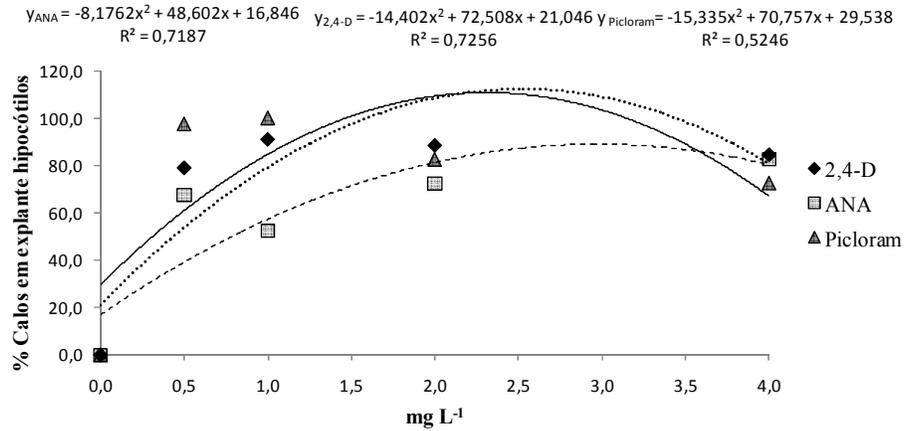


FIGURA 3 Formação de calos em segmentos de hipocótilos de ipê-branco cultivados em meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e Picloram.

Pela análise de variância (Tabela 3A), houve diferença significativa para os diferentes tratamentos utilizados na formação de calos em segmentos radiculares. A concentração de 2,61 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionou a melhor resposta (Figura 4).

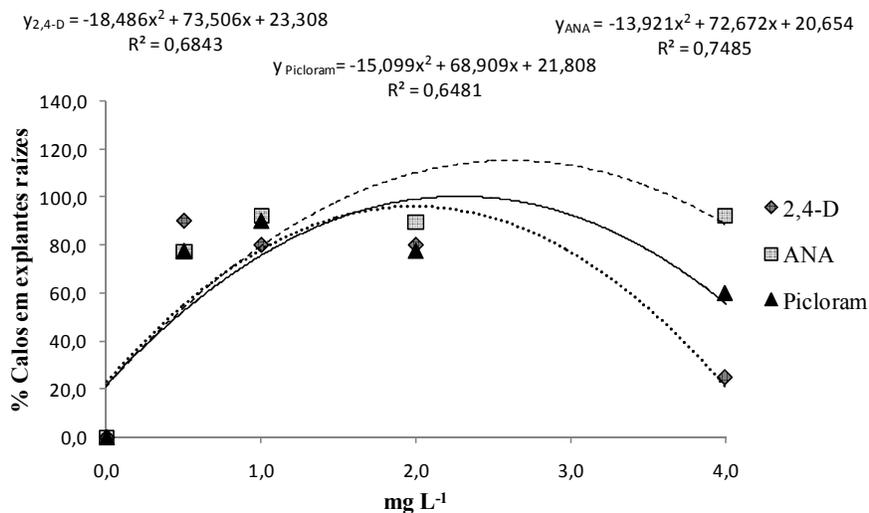


FIGURA 4 Formação de calos em segmentos de raiz de ipê-branco cultivados em meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e Picloram.

Para segmentos radiculares e em meio que continha ANA e cinetina, Ferreira et al. (2004) observaram a emissão de raízes e massa calosa de cor branca em partes do explante. O meio acrescido de 2,4-D e cinetina promoveu a formação de calos grandes, com aumento distinto do tamanho do explante.

Houve diferença entre as concentrações de ANA utilizadas na formação de calos em folhas cotiledonares, obtendo 90% de indução de calos na superfície do explante (Figura 2). Os calos apresentaram coloração branca, presença de oxidação, com um aspecto friável, podendo ser observadas a formação de estruturas globulares, semelhantes à proembrióides em 70% dos explantes (Figura 5), na concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Flores et al. (2006) também registraram calos nodulares embriogênicos nas raízes de *Pfaffia tuberosa* cultivadas com ANA em uma frequência de 100%

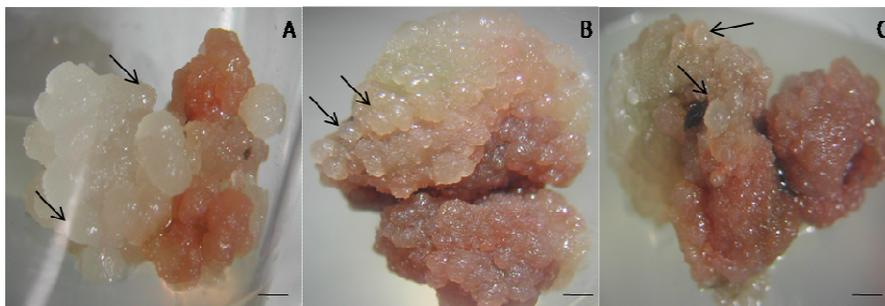


FIGURA 5 Calos embriogênicos formados a partir de segmentos cotiledonares (A), hipocotilares (B) e radiculares (C) de ipê-branco, em meio de cultura MS suplementado com  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. Barra= 1mm.

De acordo com Jiménez (2005), 2,4-D e ANA são as auxinas mais utilizadas na indução de embriões somáticos, cuja eficiência depende das concentrações utilizadas, tipo de explante, condições de cultivo e genótipo.

Os segmentos radiculares e hipocotilares não apresentaram diferença estatística na formação de calos para as diferentes concentrações de ANA (Figura 3 e 4), mas também foram observados (Figura 5) calos com coloração branca, presença de oxidação, com aspecto friável e estruturas globulares nos explantes cultivados com  $4 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo induzidos em 30% de ambos os explantes.

O efeito de concentrações de 2,4-D, ANA e BAP foram estudados na embriogênese de *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC por Dutta Gupta et al. (1997), sendo os melhores resultados obtidos com  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA.

### 3.2 Análise ultra-estrutural de calos de ipê-branco

As observações em microscopia de varredura mostraram que as células possuíam formato arredondado para os três tipos de explantes testados (folhas cotiledonares, hipocótilos e raízes). Foi possível a distinção de regiões em organização esférica, apresentando células com formato isodiamétrico semelhantes a embriões somáticos em estágio globular, o que, segundo

Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro (2003), é característico de células meristemáticas. Pode-se visualizar que os calos formados de folhas cotiledonares possuem grande intensidade de células pequenas e isodiamétricas, distinguindo-se dos outros calos, que apresentam intensidade menor de células isodiamétricas (Figura 6).

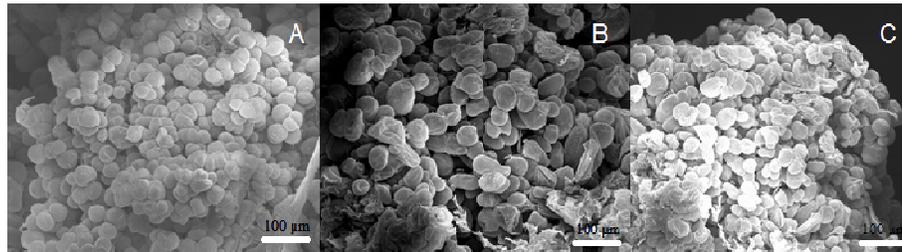


FIGURA 6 Eletromicrografia de varredura de células de calos de ipê-branco com estruturas globulares provenientes dos explantes folhas cotiledonares (A); hipocótilos (B) e raízes (C).

Os calos embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (Tomes, 1985).

A morfologia celular isodiamétrica dos calos induzidos a partir dos três diferentes explantes neste trabalho foi semelhante às células de calos de *Carya illinoensis*, para os quais o regulador de crescimento ANA induziu regiões embriogênicas (Rodríguez & Wetzstein, 1998).

### 3.3 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans

A análise de variância (Tabela 4) mostrou diferença entre as diferentes amostras de calos testadas com o corante carmim e azul de Evans. O teste com carmim confirmou a ocorrência de células pró-embriogênicas na massa de calos. Observou-se (Figura 7) que 46% das células de calos induzidos a partir de segmentos de folhas cotiledonares apresentaram reação positiva ao corante carmim.

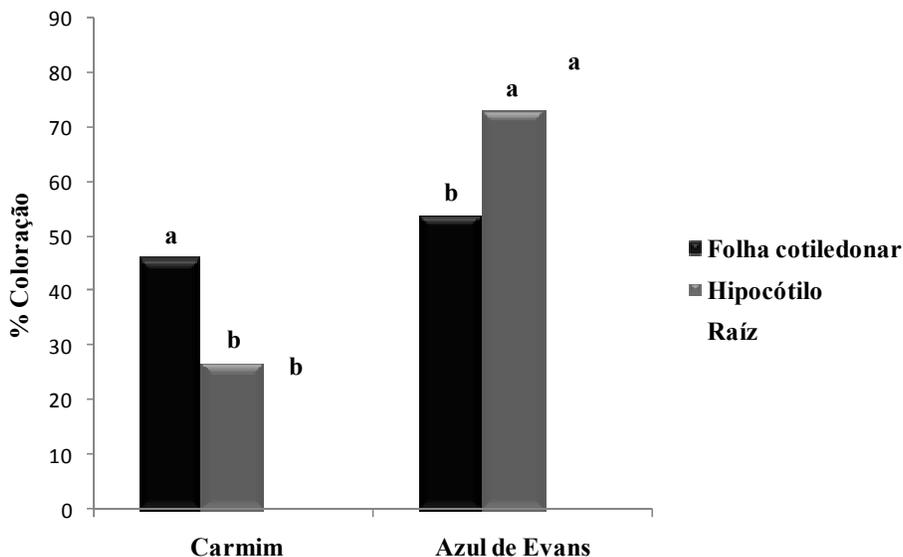


FIGURA 7 Porcentagem de coloração dos calos formados por diferentes explantes de ipê-branco cultivados *in vitro* por 30 dias. Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de barras, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

Realizando-se a análise citoquímica das células dos calos, observam-se (Figura 8) dois principais tipos celulares nas culturas embriogênicas de ipê-branco: as células embrionárias, que são isodiamétricas, pequenas, reativas ao carmim acético e com citoplasma denso e as células suspensoras que são alongadas, altamente vacuoladas e permeáveis ao corante azul de Evans. Essas células apresentam-se agrupadas em agregados celulares presentes nas culturas embriogênicas durante a multiplicação. Os agregados celulares apresentam variação no tamanho e morfologia, revelando diferentes afinidades com os corantes durante a análise citoquímica, conforme já observado por Steiner et al. (2005) e Silveira et al. (2006). A reação positiva ao carmim acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular (Durzan,

1988; Steiner et al., 2005). As diferenças na morfologia celular podem ser influenciadas por diversos fatores tais como fonte de explante, composição do meio de cultura e alguma forma de estresse (Fehér et al., 2003). Dessa forma, a análise realizada em ipê-branco indica que os diferentes explantes influenciam na porcentagem de formação de células pró-embriogênicas após a indução de calos.

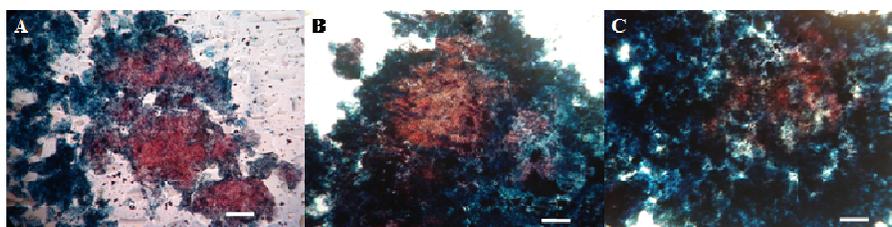


FIGURA 8 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos a partir de segmentos cotiledonares (A), hipocotilares (B) e radiculares (C) de ipê-branco, em meio de cultura MS suplementado com 4 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Barra= 10 μm.

#### 4 CONCLUSÕES

- Maior porcentagem de indução de calos em explantes de folhas cotiledonares ocorre com a suplementação do meio MS com 2,39 mg L<sup>-1</sup> de Picloram.

- A maior indução de calos em explantes de hipocótilo ocorre com a suplementação do meio MS com 2,51 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

- A maior indução de calos em explantes de raiz ocorre com a suplementação do meio MS com 2,61 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

- Para todos os explantes, apenas a adição de 4 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporciona calos com características embriogênicas, como formato isodiamétrico.

- Os calos provenientes do explante folha cotiledonar possuem maior formação de células pró-embriogênicas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADÉ, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALMEIDA, E. P.; OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 51-54, jan./mar. 2001.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438 p.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D.C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. e Hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 609-617, out./dez. 2003.

CHEE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Somatic embryos in sweetpotato. In: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P. A. (Ed.). **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee, Alabama EUA: Tuskegee University, 1992. p. 39-46.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: SYMPOSIUM DEPARTMENT OF FOREST GENETICS AND PLANT PHYSIOLOGY, 1988, Swedish. **Proceedings...** Swedish: University of Agricultural Sciences, 1988. v. 8, p. 147-186.

DUTTA GUPTA, S.; AHMED, R.; DE, D. N. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from seedling leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. **Plant Cell Report**, New York, v. 16, n. 9, p. 628-31, June 1997.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, Sept. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, M. das G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de calos embriogênicos em explantes de cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 372-374, ago. 2004.

FERREIRA, M. das G. R.; CARVALHO, C. H. S. de; CARNEIRO, A. de A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.

GARIN, E.; GRENIER, E.; GRNIER-DE MARCH, G. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 83-91, Feb. 1997.

GUERRA, P. M.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Produção de Informação/ Embrapa Hortaliças, 1999. v. 2, p. 533-568.

HÄGGMAN, H.; JOKELA, A.; KRAJNAKOVA, J.; KAUPPI, A.; NIEMI, K.; ARONEN, T. Somatic embryogenesis of Scot pine: cold treatment and characteristics of explant affeting induction. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 341, p. 1769-1778, Dec. 1999.

HIRAI, G.; KASAI, N.; HARADA, T. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryo culture of *Glehnia littoralis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 175-180, Feb. 1997.

IANTCHEVA, A.; SLAVOV, S.; PRINSEN, E. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 1, p. 37-43, Apr. 2005.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 196-223, June 2001.

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

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; BARRO, R. S. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 123-130, feb. 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, p. 53.

MONTEIRO, M.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VALARINI, M. J.; OLIVEIRA, C. A. de; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplasts of alfafa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 683-689, Oct./Dec. 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl.2, p. 48-50, jul. 2007.

PARK, S. Y.; AHN, J. K.; LEE, W. Y.; MURTHY, K. N.; PAEK, K. Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 5, p. 1221-1225, May 2005.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 81, n. 1, p. 93-107, Jan. 1995.

RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenesis cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, New York, v. 204, n. 1/2, p.71-83, Mar. 1998.

ROUT, G. R.; DAS, P. Somatic embryogenesis in *Simarouba glauca*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 79-81, Apr. 1994.

RUFFONI, B.; DAMIANO, C.; MASSABÒ, F.; ESPOSITO, P. Organogenesis and embryogenesis in *Lisianthus russellianus* Hook. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 280, p. 83-88, 1990.

SILVEIRA, V.; SANTA – CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F. E.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, Limerick, v. 171, n.1, p. 91-98, July 2006.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, Nov. 2005.

SUN, Y.; ZANG, X.; JIN, S.; LING, S.; NIE, Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 247-253, Dec. 2003.

TEIXEIRA, B. J.; MARBACH, P. A. S. Otimização do processo de embriogênese somática em cacau (*Theobroma cacao* L.). **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 29, p. 100-103, 2002.

THORPE, T. A. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 558 p.

TOMES, D.T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.). **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**. Boston: Nijhoff/Junk, 1985. p.175-203.

WU, I. F.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from rootderived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 107-109, Apr. 2004.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, Oct. 1993.

## **CAPÍTULO 3**

### **INDUÇÃO DE CALOS ORGANOGÊNICOS EM IPÊ-BRANCO**

## RESUMO

O ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.) é uma espécie nativa do Brasil e suas sementes perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas, mantendo-se por cerca de quatro meses e sua germinação é muito baixa, de aproximadamente 40%. O presente estudo teve por objetivo estudar a indução de calos organogênicos, visando à posterior regeneração de plantas como uma alternativa para a produção de mudas de ipê-branco. Foram utilizados como explante, segmentos de folhas cotiledonares, de cotilédones, de hipocótilos e de raízes provenientes de plântulas de ipê-branco com 20 dias de germinação *in vitro*. Os diferentes explantes foram inoculados em meio MS suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e as citocininas TDZ e cinetina nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Não houve formação de calos utilizando a cinetina. O TDZ foi eficiente na indução de calos em segmentos de folhas cotiledonares, hipocótilos, raízes e cotilédones, sendo que nesse último, observou-se a formação de brotações. O maior número de brotação foi observado em explantes cultivados na concentração de 1,79 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.

Palavras-chave: *Tabebuia roseo-alba*; calos organogênicos; TDZ

## ABSTRACT

'Ipê-branco' (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.) is a native specie from Brazil. Its seeds lose their viability rapidly when stored. They could remain stored for about four months. Nonetheless, the germination percentage of this species is very low, reaching around 40%. The current work aimed to study the induction of organogenic callus. This technology allows subsequent regeneration of plants as an alternative for the 'ipê-branco' seedlings production. Seeds were *in vitro* germinated. After 20 days, cotyledonary leaves, cotyledons, hypocotyls and roots segments excised from these seedlings were used as explants. They were inoculated on MS medium supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), agar (5.0 g L<sup>-1</sup>) and different cytokinins. The effect of TDZ and kinetin at concentrations 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L<sup>-1</sup> was evaluated. There was no formation of callus using kinetin. TDZ was effective in inducing callus in all explants used. However, in the cotyledons was also observed shoots formation. The largest shoot number was obtained in explants cultured at 1.79 mg L<sup>-1</sup> TDZ.

Keywords: *Tabebuia roseo-alba*; organogenic callus; TDZ

## 1 INTRODUÇÃO

As sementes do gênero *Tabebuia* perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas, mantendo-se por cerca de quatro meses (Cabral et al., 2003). Lorenzi (2000) também relata que sua germinação é muito baixa, de aproximadamente 40%.

Dessa forma, técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido de grande utilidade na resolução de diversos problemas de várias espécies e, dentre elas, a regeneração de brotações adventícias a partir de calos.

A organogênese *in vitro* pode ser definida como o processo no qual células e tecidos são induzidos a sofrer mudanças que levam à produção de uma estrutura unipolar, denominada primórdio vegetativo, cujo sistema vascular está frequentemente conectado ao tecido de origem. Pode ocorrer diretamente, a partir de células do explante original, ou indiretamente, via formação de calos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Esse processo pode ser influenciado por diversos fatores, como genótipo, composição do meio de cultura, ambiente, tempo (período de sub-cultivo) e nas interações entre os fatores acima mencionados (Mc Cown & Sellmer, 1987). Baseando-se nestes aspectos, a formação de brotos em cultura *in vitro* vem sendo obtida a partir de diversos tipos de explantes, como segmento nodal e internodal (Herve et al., 2001; Rahim et al., 2003), discos foliares (Subbaiah & Minocha, 1990; Laine & David, 1994; Barreto Cid et al., 1999; Herve et al., 2001;), segmentos cotiledonares (Dibax, 2005) e hipocotiledonares (Azmi et al., 1997).

Em geral, são reconhecidas três fases da organogênese, sendo essas determinadas com base no requerimento temporal de um balanço específico de fitohormônios para o controle da organogênese. Na primeira fase, as células dos explantes adquirem competência, que é definida como a habilidade de responder

a sinais hormonais de indução de órgãos. O processo da competência para a organogênese é referido como “desdiferenciação”, em que células dos explantes cultivados são estimuladas a formar um órgão específico sob a influência do balanço de fitohormônios durante a segunda fase. Assim, a morfogênese ocorre independentemente das fontes exógenas de fitohormônios durante a terceira fase (Sugiyama, 1999).

A indução de calos e regeneração de plantas via organogênese pode ser relatada em diferentes espécies, como em *Gomphrena officinalis* (Mercier et al., 1992), *Cuminum cyminum* (Ebrahimie et al., 2003) e *Pfaffia tuberosa* (Flores & Nicoloso, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi realizar a indução de calos organogênicos em ipê-branco, testando diferentes fontes de explantes submetidos a diferentes reguladores de crescimento acrescidos ao meio de cultura.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Indução de calos organogênicos em ipê-branco**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Como material vegetal, foram utilizadas folhas cotiledonares, hipocótilos e raízes obtidas de plântulas de ipê-branco com 20 dias de germinação *in vitro* e cotilédones. Para esse processo, foram utilizadas sementes cedidas pela CEMIG – Lavras/MG, as quais foram levadas para câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% (v/v) por 20 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 20 minutos,

sendo, posteriormente, lavadas três vezes com água destilada e autoclavada, para o processo de desinfestação. Em seguida, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (23 x 137 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3,0% de sacarose, 0,5% de ágar e acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (Abbade, 2008). O pH dos meios foi ajustado para 5,8, sendo, posteriormente, autoclavado a uma temperatura de 121° C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram transferidos para sala de crescimento, onde foram mantidos com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a 25 ± 2°C. Para os cotilédones, foi utilizado o mesmo processo de desinfestação.

As folhas cotiledonares foram excisadas com diâmetro médio de 1 cm e os hipocótilos e raízes, com diâmetro médio de 1 cm de comprimento. Os cotilédones foram excisados longitudinalmente, separando-os do eixo embrionário e, posteriormente, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (23 x 137 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio de cultura MS suplementado com 3,0% de sacarose e 0,5% de ágar. Ao meio de cultura foram acrescentados os tratamentos constituídos dos reguladores de crescimento cinetina ou thidiazuron (TDZ), nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg L<sup>-1</sup> e, ainda, um tratamento controle, sem a presença de regulador de crescimento. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e realizou-se autoclavagem a uma temperatura de 121° C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram transferidos para sala de crescimento, onde foram mantidos com fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de fótons de 43 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e temperatura a 25 ± 2°C. A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação, observando-se a porcentagem de formação de calos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio com um

explante. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão no programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Indução de calos organogênicos em ipê-branco**

Não houve formação de calos em nenhum dos 4 explantes testados quando não foram acrescentados reguladores de crescimento no meio de cultura MS. Também não ocorreu calogênese quando se utilizou cinetina no meio de cultura.

Avaliando-se a porcentagem de indução de calos na superfície dos diferentes explantes de ipê-branco observaram-se diferenças (Tabela 5A) para as diferentes concentrações de TDZ. Entre os explantes, a maior indução de calos foi observada em segmentos de cotilédones na concentração de 2,27 mg L<sup>-1</sup> de TDZ (Figura 9A).

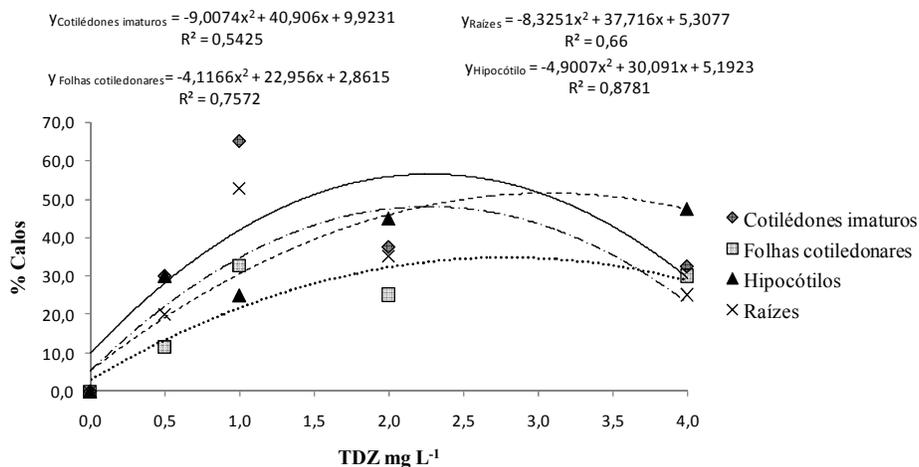


FIGURA 9 Formação de calos em diferentes explantes de ipê-branco cultivados em meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de TDZ.

Observou-se também (Tabela 6A) diferença na formação de brotações em calos de cotilédones cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de TDZ, podendo ser observado na Figura 10 que a maior média foi de 2,17 brotações por explante, na concentração de 1,79 mg L<sup>-1</sup>.

Diversos trabalhos relatam o efeito da indução de brotações provenientes de calos com diferentes concentrações de TDZ, como o de Gribaudo & Fronda (1991) na cultura *in vitro* de *Vitis vinifera* e de Le Roux & Van Staden (1991) para a *Eucalyptus saligna*, *E. smithii*, *E. macarthurii* e para o híbrido *E. macarthurii* x *E. grandis*.

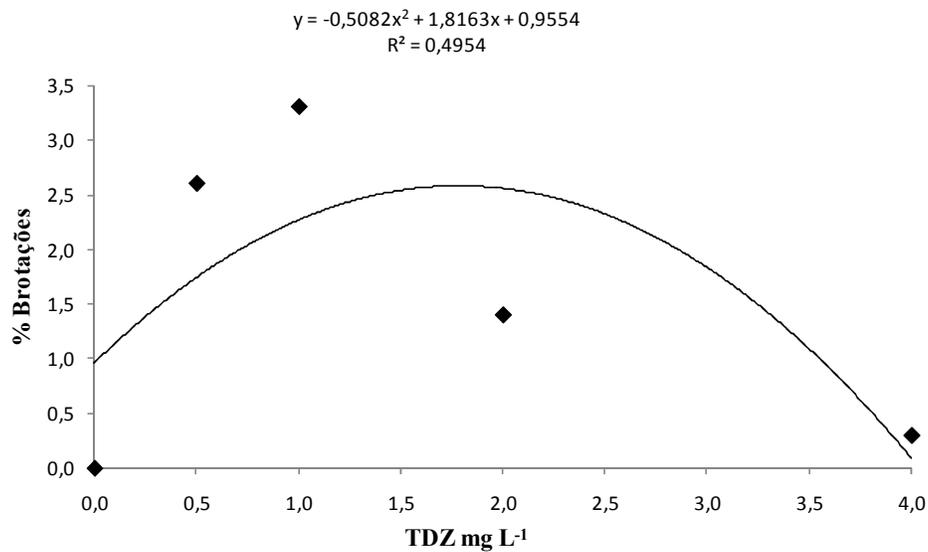


FIGURA 10 Indução de brotações em segmentos de cotilédones de ipê-branco cultivados em meio de cultura MS, acrescido de diferentes concentrações de TDZ.

Nos calos formados após 30 dias de cultivo, observa-se a formação de brotações em calos com coloração verde (FIGURA 11).

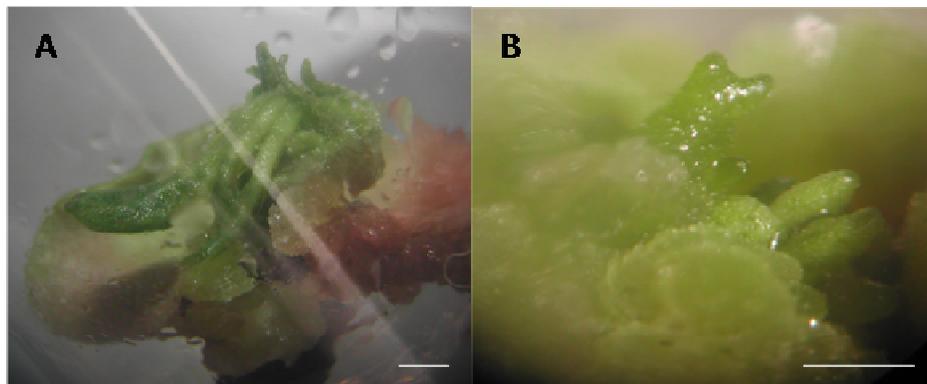


FIGURA 11 Visão geral (A) e em detalhe (B) de calos organogênicos a partir de segmentos cotiledonares de ipê-branco, em meio de cultura MS suplementado com 1,79 mg L<sup>-1</sup> de TDZ. Barra= 1mm.

O uso de uma combinação hormonal que favoreceu o crescimento do calo e ao mesmo tempo a regeneração indireta foi relatado em *Cuminum cyminum* L. (Ebrahime et al., 2003). Já em *Gomphrena officinalis* Mart., a presença do ANA em concentrações superiores a 0,5 mg L<sup>-1</sup> inibiu a regeneração indireta (Mercier et al., 1992).

#### 4 CONCLUSÕES

- O uso de cinetina não é eficiente para a indução de calos nos explantes, folha cotiledonar, cotilédone, hipocótilo e raiz.

- A maior indução de brotação ocorre com a adição de 1,79 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, utilizando cotiledonares de ipê-branco como explantes.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRÉ, P.; PROTEAU, M.; BOUDET, A. M.; CHRIQUI, D. High frequency plant regenerants from *Eucalyptus globulus* labill hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 9-16, Oct. 1997.

BARRUETO CID, L. P.; MACHADO, A. C. M. G.; CAVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 17-23, Jan. 1999.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. e Hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 609-617, out./dez. 2003.

DIBAX, R.; EISFELD, C. de L.; CUQUEL, F. L.; KOEHLER, H.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptuscamaldulensis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 406-412, July/Aug. 2005.

EBRAHIMIE, E.; HABASHI, A. A.; GHAREYAZIE, B.; GHANNADHA, M.; MOHAMMADIE, M. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumim (*Cuminum cyminum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 1, p. 19-25, Oct. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T. Embriogênese somática e organogênese indireta em *Pfaffia tuberosa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 993-995, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 8, p. 1083, Aug. 1991.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 4, p. 645-653, Sept. 2001.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, n. 8, p. 473-476, May 1994.

LE ROUX, J. J.; STADEN, J. van. Micropropagation of *Eucalyptus species*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 2, p. 199-200, Feb. 1991.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, p. 53.

MCCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for wood plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 4-13.

MERCIER, H.; VIEIRA, C. C. J. ; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 28, n. 3, p. 249-254, Mar. 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

RAHIM, F.; JABEEN, M.; ILAHI, I. Mass propagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 2, p. 184-187, 2003.

SUBBAIAH, M. M.; MINOCHA, S. C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, n. 7, p. 370-373, Nov. 1990.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, n. 1, p. 61-64, Apr. 1999.

## **CAPÍTULO 4**

### **ACLI MATI Z A Ç Ã O DE PL Â N T U L A S DE IP Ê - B R A N C O**

## RESUMO

O conhecimento das alterações morfológicas de plantas desenvolvidas *in vitro* é fundamental para o estabelecimento de protocolos eficazes à sobrevivência de plantas oriundas de ambientes controlados nas condições naturais. O presente estudo teve por objetivo analisar a aclimatização de plântulas de ipê-branco produzidas *in vitro* e ainda comparar a estrutura anatômica entre folhas de plântulas germinadas *in vitro* e as aclimatizadas em diferentes substratos. Para a aclimatização, plântulas de ipê-branco foram retiradas do cultivo *in vitro* e transferidas para tubetes contendo Plantmax, vermiculita, areia e a combinação Plantmax+vermiculita+areia. Verificou-se 100% de pegamento, sendo que as plântulas aclimatizadas no substrato Plantmax apresentaram melhor desenvolvimento. Para o estudo anatômico, cortes transversais e paradérmicos foram realizados nas lâminas foliares de plântulas provenientes do cultivo *in vitro* e de plântulas já aclimatizadas nos diferentes substratos. Observaram-se diferenças anatômicas nas lâminas foliares de plântulas proveniente do ambiente *in vitro* em comparação com as aclimatizadas em diferentes substratos. A densidade estomática, o diâmetro polar e equatorial das folhas oriundas do ambiente *in vitro* foram maiores em relação às aclimatizadas. A relação DP/DE foi menor para as folhas em ambiente *in vitro* e, comparando-se os diferentes substratos, maior nas plântulas aclimatizadas com vermiculita. O mesofilo e as epidermes adaxial e abaxial se apresentaram menores em plantas produzidas *in vitro* e, entre os substratos, as plântulas aclimatizadas com Plantmax apresentaram-se maiores, com maior espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso.

Palavras-chave: *Tabebuia roseo-alba*; aclimatização; anatomia foliar

## ABSTRACT

Knowledge of morphological changes of *in vitro* plants is essential for establishing effective protocols for plants survival from controlled environments in natural conditions. This study aimed to examine the acclimatization of *in vitro* *Tabebuia roseo-alba* seedlings and to compare anatomical structure of leaves from seedlings *in vitro* germinated and acclimatized in different substrates. For acclimatization, *Tabebuia roseo-alba* seedlings were taken from *in vitro* culture and transferred to tubettes containing Plantmax<sup>®</sup>, vermiculite, sand and vermiculite +Plantmax<sup>®</sup>+sand. It was observed 100% survival of the acclimatized seedlings. The best plants development was obtained using Plantmax<sup>®</sup> substrate. For the anatomical study were made paradermal and transverse cuts in leaves obtained from *in vitro* culture and acclimatized seedlings in different substrates. Anatomical differences were observed between leaves from *in vitro* seedlings and ones that were acclimatized. The stomatal density and polar and equatorial diameter of *in vitro* leaves were higher than that ones were acclimatized. On the other hand, leaves from *in vitro* culture presented PD/ED relation lower and mesophyll and adaxial and abaxial epidermis smaller than acclimatized leaves. Comparing the different substrates, leaves of seedlings acclimatized with vermiculite presented PD/ED relation higher than *in vitro* leaves. Moreover, seedlings acclimatized using Plantmax<sup>®</sup> were higher, with greater thickness of palisade and spongy parenchyma.

Keywords: *Tabebuia roseo-alba*; acclimatization; leaf anatomy

## 1 INTRODUÇÃO

Técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido de grande utilidade na resolução de diversos problemas de várias espécies, mas um grande número de plantas pode não sobreviver à transferência das condições *in vitro* para casa de vegetação. A maioria das espécies que crescem *in vitro* requer um processo de aclimatização para sobreviver e crescer quando transferidas para o solo (Preece & Sutter, 1991).

A aclimatização pode ser definida como a transferência da planta da condição *in vitro* para o ambiente natural ou para um ambiente intermediário, como casa de vegetação ou telado (Debergh & Maene, 1981). A principal causa da baixa sobrevivência é a excessiva perda de água pelas plantas durante esse processo (Sutter & Lamghans, 1982).

Para a preparação das mudas, o substrato utilizado é de grande importância na aclimatização, uma vez que pode facilitar ou impedir o crescimento das raízes conforme o espaço de aeração, sua capacidade de retenção de água e suas propriedades físico-químicas (Calvete, 1998). Várias são as misturas utilizadas na composição de substratos para plantas que passaram pelo processo de aclimatização, devendo-se levar em consideração as propriedades químicas e físico-hídricas, pois essas influenciam na relação água/ar do substrato e na disponibilidade e absorção de nutrientes (Fernandes & Corá, 2000).

Diversos estudos histológicos demonstraram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciados se comparados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação (Louro et al., 2003; Apóstolo et al., 2005;). Além disso, o número e o formato dos estômatos também são afetados, o que pode acarretar uma maior ou menor eficiência fotossintética da planta (Osório et al., 2005).

O uso de diferentes substratos com resultados eficientes para a aclimatização de diversas plantas já foi verificado por vários autores (Vichiato et al., 1998; Brasil et al., 1999; Sediyaama et al., 2000; Souza, 2001; Mendonça et al., 2003).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a aclimatização para plântulas de ipê-branco produzidas *in vitro* e, ainda, comparar anatomicamente folhas de plântulas germinadas *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aclimatização de plântulas de ipê-branco germinadas *in vitro*

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Como material vegetal, foram utilizadas sementes cedidas pela CEMIG – Lavras/MG. Para a desinfestação, as sementes foram imersas, em câmara de fluxo laminar, em álcool 70% (v/v) por 20 segundos e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 20 minutos e, posteriormente, lavadas 3 vezes com água destilada e autoclavada.

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (23 x 137 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3,0% de sacarose, 0,5% de ágar e acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. O pH dos meios foi ajustado para 5,8, sendo autoclavado em seguida a uma temperatura de 121° C e 1 atm de pressão, por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram transferidos para sala de

crescimento, onde foram mantidos com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , em temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para aclimatização, as plântulas foram transferidas, 30 dias após a inoculação, para tubetes de polietileno com capacidade para  $288 \text{ cm}^3$ , preenchidos com os substratos: areia, Plantmax, vermiculita e a mistura de areia: Plantmax:vermiculita (P.V.A.), na proporção de 1:1:1. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento e cobertas com sacos plásticos transparentes e os tubetes foram parcialmente imersos em água destilada. A cobertura plástica foi perfurada, gradativamente, durante 30 dias, quando foi totalmente removida. As plantas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de  $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Após 30 dias de aclimatização, foram avaliados o número de folhas, comprimento das raízes e da parte aérea. Os dados foram analisados por meio do software SISVAR (Ferreira, 2000) e os resultados comparados pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

## **2.2 Análises anatômicas**

Para realização dos estudos anatômicos, foram coletadas folhas completamente expandidas do terço superior de plântulas de ipê-branco após 30 dias de aclimatização, fixadas em FAA 70% (Formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico 70%) por 72 horas e, posteriormente, conservadas em álcool etílico 70% (Johansen, 1940). O estudo anatômico das folhas baseou-se no exame microscópica de seções transversais, obtidas com micrótomo manual, e de seções paradérmicas das superfícies abaxial e adaxial das folhas, obtidas à mão livre, ambas da região mediana das folhas.

As seções transversais foram clarificadas com hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada, coradas com azul de astra e safranina e montadas em glicerina 50%, segundo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). As

determinações da espessura dos tecidos foram realizadas com ocular micrométrica acoplada em microscópio de luz.

As lâminas com seções paradérmicas das faces abaxial e adaxial das folhas foram montadas com solução corante de safranina 1% em água glicerinada. A contagem do número de estômatos foi realizada em microscópio OLYMPUS CBB, utilizando-se câmara clara. A densidade estomática foi expressa em número de estômatos por  $\text{mm}^2$ , segundo a técnica de Labouriau et al. (1961). Foram quantificadas as espessuras dos parênquimas paliádicos e esponjosos, das epidermes adaxial e abaxial das folhas, diâmetro polar e equatorial dos estômatos e a densidade estomática das folhas de ipê-branco.

As medições de espessura, densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos foram analisadas utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por três medidas para espessura e quatro para densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Aclimatização de plântulas de ipê-branco germinadas *in vitro***

A análise estatística não revelou diferença entre os comprimentos da parte aérea das plantas aclimatizadas nos diferentes substratos, mas os tratamentos testados influenciaram o comprimento de raiz e o número de folhas (Tabela 1). Foi registrada uma taxa de 100% de sobrevivência das plântulas em todos os substratos testados.

TABELA 1 Efeito de diferentes substratos sobre o comprimento da parte aérea, comprimento de raiz e número de folhas de ipê-branco aos 30 dias de aclimatização.

| Substratos          | % de sobrevivência* | Comp. parte aérea (cm)* | Comp.de raiz (cm)* | nº de folhas* |
|---------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|---------------|
| Areia               | 100 a               | 5,46 a                  | 5,51 b             | 9,0 a         |
| Plantmax            | 100 a               | 6,30 a                  | 19,73 a            | 7,6 ab        |
| Vermiculita         | 100 a               | 5,76 a                  | 15,57 a            | 6,4 b         |
| P.V.A. <sup>1</sup> | 100 a               | 6,82 a                  | 17,67 a            | 7,4 ab        |

\* Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 5%. <sup>1</sup> P.V.A. = Plantmax® + Vermiculita + Areia.

Nos substratos Plantmax e P.V.A., verificou-se que foram formadas plantas com folhas maiores (Figura 12). Plantas aclimatizadas em vermiculira apresentaram necrose nas folhas. Nascimento (2008) observou 69% de sobrevivência de plântulas de uvaia aclimatizadas em Plantmax.

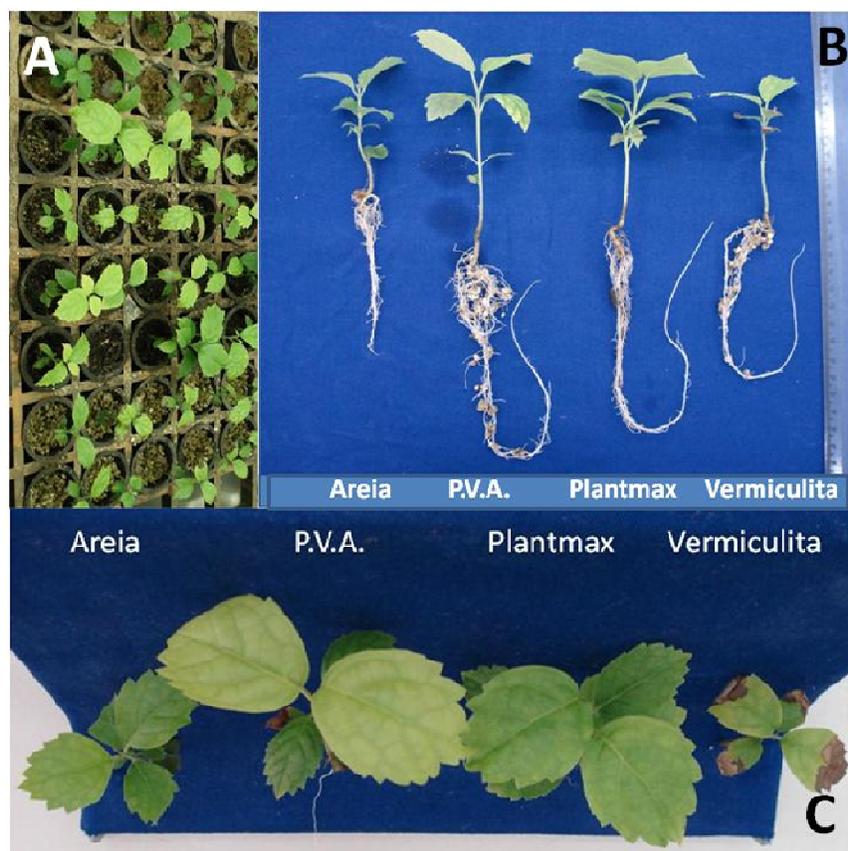


FIGURA 12 Visão geral (A); Plantas (B); Folhas (C). Plantas aclimatizadas de ipê-branco.

Analisando o comprimento das raízes formadas as quais apresentaram menor comprimento 5,51 cm (Tabela 1) observou-se que este foi influenciado pelo substrato areia. Ao contrário, nesse substrato houve formação de maior número de folhas (9), semelhante ao número de folhas formadas em plantas aclimatizadas nos substratos Plantmax e na mistura P.V.A. Plantas aclimatizadas em vermiculita apresentaram a menor formação de folhas (6,4).

Moreira (2001) observou na aclimatização de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola que em relação às variáveis altura da planta e número de folhas, o

Plantmax foi o segundo melhor substrato, tendo sido enriquecido de 40% de terra + 30% de esterco bovino. No presente trabalho, observou-se que o substrato Plantmax e a combinação Plantmax+vermiculita+areia foram melhores no desenvolvimento da parte aérea, raiz e no número de folhas de ipê-branco aclimatizadas.

Segundo Gislrod (1982) e Hartmann et al. (1990), o substrato deve ter boa capacidade de retenção de água, volume ótimo de espaços porosos preenchidos por gases e adequada taxa de difusão de oxigênio necessário à respiração das raízes. O Plantmax apresenta características que favorecem o crescimento de mudas após emissão das raízes adventícias: quais sejam as propriedades físicas (porosidade, textura, drenagem e baixa compactação) e químicas (presença de nutrientes e pH adequado ao desenvolvimento de muda) (Hoffmann et al., 2001).

## **3.2 Análises anatômicas**

### **3.2.1 Seções paradérmicas**

Analisando-se as seções paradérmicas de folhas de ipê-branco, verificou-se a presença de estômatos somente na epiderme abaxial das lâminas foliares, tanto nas plantas cultivadas *in vitro*, quanto naquelas aclimatizadas nos diferentes substratos, caracterizando o ipê-branco como espécie hipoestomática, conforme já havia sido observado por Abbade (2008).

Na Figura 13, pôde-se verificar que os estômatos das folhas aclimatizadas apresentaram formato elíptico, enquanto estômatos das folhas produzidas *in vitro* apresentaram formato mais circular.

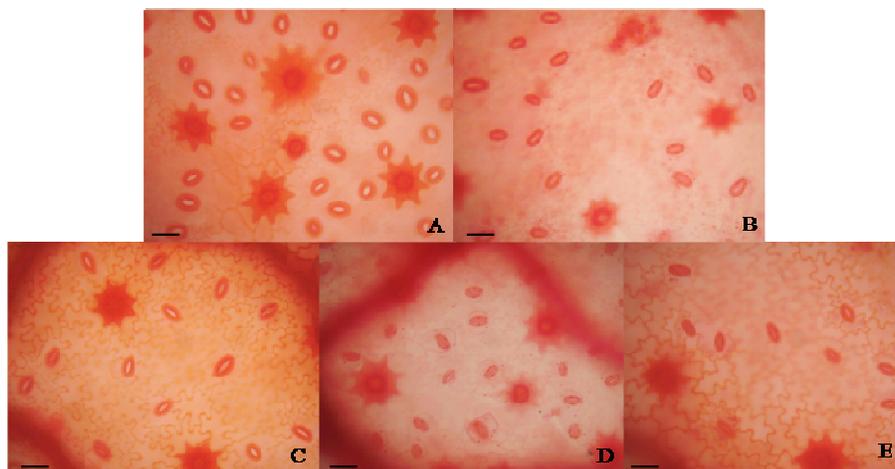
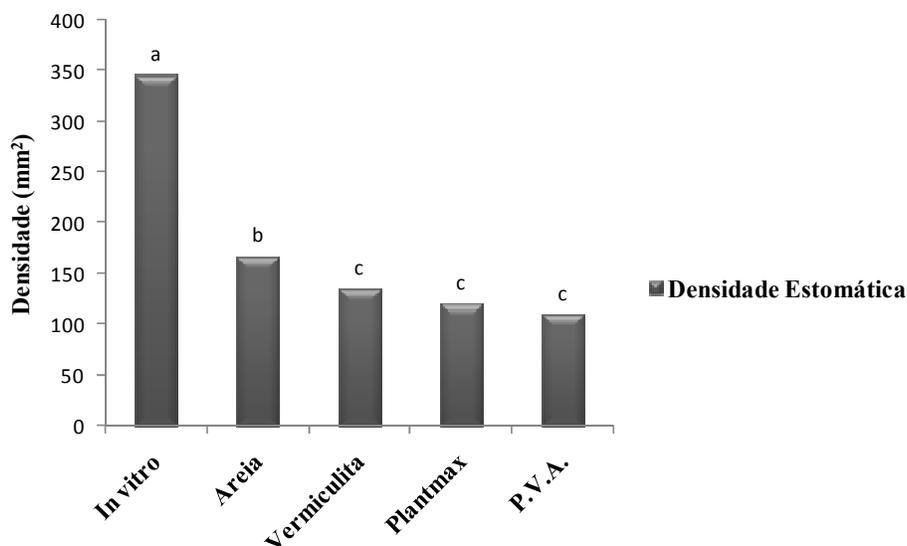


FIGURA 13 Fotomicrografia de seções paradérmicas de folhas de ipê-branco cultivados *in vitro* (A) e aclimatizadas em areia (B), Plantmax (C), P.V.A. (D) e vermiculita (E). Barra= 10  $\mu$ m.

Analisando as seções paradérmicas, das plantas produzidas *in vitro* e de plantas aclimatizadas em diferentes substratos, observou-se uma diferença em relação à densidade estomática (Tabela 7A). Ocorreu maior número de estômatos por área em plantas oriundas de cultivo *in vitro*, com média de 345,33 estômatos por  $\text{mm}^2$ . Entre as plantas aclimatizadas, o substrato areia proporcionou a formação de maior número de estômatos por área foliar (Figura 14).



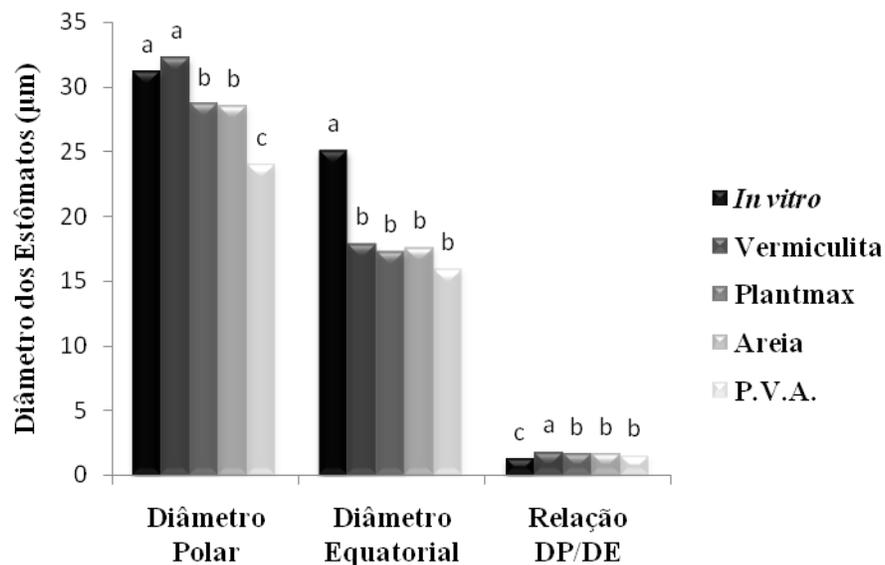
\* Médias seguidas de mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

FIGURA 14 Densidade estomática do tecido epidérmico abaxial de lâminas foliares de ipê-branco cultivadas *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos por 30 dias.

Também se observou diferença estatística entre os diâmetros polares e equatoriais e da relação (DP/DE) (Tabela 8A). O maior diâmetro polar foi observado nas plantas produzidas *in vitro*, com média de 31,2  $\mu\text{m}$ . Dentre as plantas em processo de aclimatização, as cultivadas em vermiculita, apresentaram média de 32,25  $\mu\text{m}$ . A menor média de diâmetro polar foi observada nas plantas aclimatizadas em P.V.A., com média de 24  $\mu\text{m}$ . A maior média de diâmetros equatorial (25,05  $\mu\text{m}$ ) foi observada nas plantas produzidas *in vitro*. Não se observou diferença entre as plantas dos demais tratamentos. A maior relação (DP/DE) ocorreu nas plantas aclimatizadas em substrato vermiculita, 1,83  $\mu\text{m}$ , enquanto a menor média foi observada nas plantas produzidas *in vitro* (1,26  $\mu\text{m}$ ) (Figura 15). Também El-Bahr et al. (2003)

verificaram menor relação DP/DE para os estômatos de plantas cultivadas *in vitro* do que em plantas aclimatizadas.

Rocha (2005) discute que a maior relação DP/DE juntamente com o formato elíptico dos estômatos constituem características importantes que indicam a funcionalidade dos estômatos. Afirmação condizente com os resultados obtidos no presente trabalho, pois a relação DP/DE de plântulas *in vitro* foi menor em relação às aclimatizadas.



\* Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de barras, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

FIGURA 15 Diâmetros polares (DP) e equatoriais (DE) e relação (DP/DE) de estômatos do tecido epidérmico abaxial de lâminas foliares de ipê-branco cultivados *in vitro* e aclimatizados em diferentes substratos por 30 dias.

### 3.2.2 Seções transversais

Analisando as seções transversais, tanto as folhas cultivadas *in vitro* como as aclimatizadas apresentaram organização dorsiventral, conforme se

visualiza na Figura 16. De acordo com (Metcalfe & Chalk, 1957), todas as espécies de Bignoniaceae são dorsiventrais, sendo registrada estrutura isobilateral apenas no gênero *Kigelia*.

As seções transversais demonstraram que em todas as condições de cultivo, ambas as epidermes se mostraram compostas por apenas uma camada de células, caracterizando-as como epiderme uniestratificada (FIGURA 16).

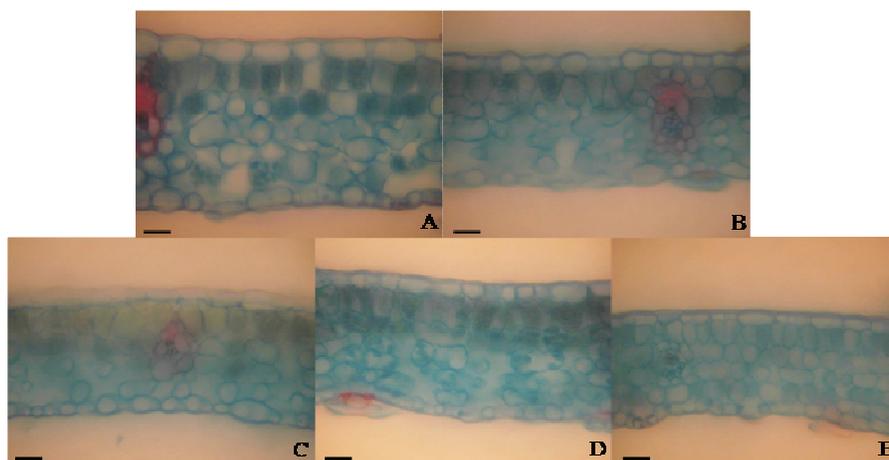


FIGURA 16 Fotomicrografia de seções transversais de folhas de ipê-branco aclimatizadas em Plantmax (A) P.V.A. (B), vermiculita (C), areia (D) e cultivadas *in vitro* (E). Barra= 10  $\mu$ m.

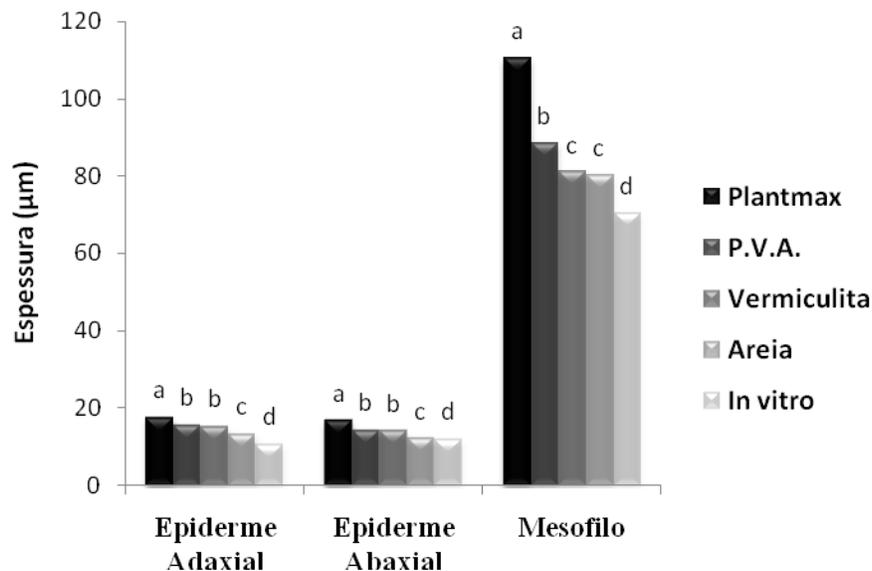
Abbade (2008) observou a mesma característica em folhas de ipê-branco de campo. O espessamento da cutícula foi menor nas folhas de plântulas cultivadas *in vitro* em relação às aclimatizadas. Segundo Alquini et al. (2003), o espessamento da cutícula confere uma proteção natural contra a ação da radiação solar. Verificou-se também a presença de tricomas estrelados em ambas as epidermes para todos os tratamentos.

O parênquima esponjoso das plântulas cultivadas *in vitro* apresentou de 2 a 3 camadas de células e espaços intercelulares menores que as plantas aclimatizadas nos diferentes substratos, observando-se nessas, de 3 a 4 camadas

de células. O parênquima paliçádico foi constituído por uma camada, sendo que as células das plantas aclimatizadas se apresentavam mais alongadas e justapostas do que nas condições *in vitro* (Figura 16).

Segundo Lee et al. (2000), células paliçádicas mais alongadas constituem uma adaptação das plantas à alta intensidade luminosa. Espera-se que, quanto mais espesso o parênquima paliçádico, maiores sejam também as taxas fotossintéticas (Bolhar-Vordenkampf & Draxler, 1993), processo esse fundamental ao crescimento e desenvolvimento vegetal.

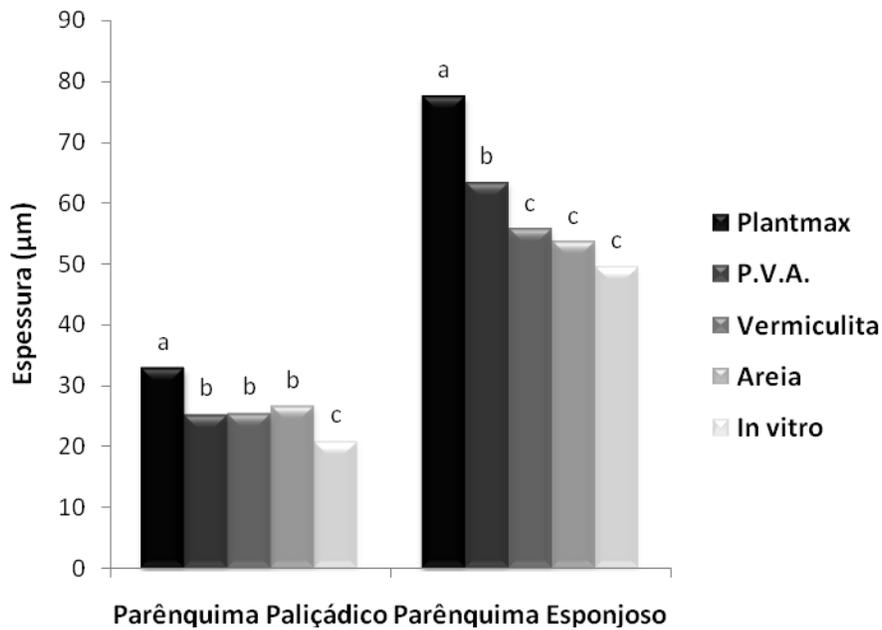
De acordo com a análise de variância (Tabela 9A), comparando-se as plântulas cultivadas *in vitro* e as aclimatizadas em diferentes substratos, observou-se diferença estatística para a espessura da epiderme adaxial e abaxial e o mesofilo, com as maiores médias para as plantas aclimatizadas em Plantmax, com 17,7 µm de epiderme adaxial, 16,8 µm para a abaxial e 110,4 µm para o mesofilo. Menores espessuras foram observadas nas plantas produzidas *in vitro*, com médias de 10,65 µm para a epiderme adaxial, 12 µm para a abaxial e de 70,35 µm para o mesofilo (Figura 17).



\* Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de barras, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

FIGURA 17 Epiderme das faces adaxial e abaxial e mesofilo de folhas de ipê-branco cultivadas *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos por 30 dias.

Também se observou diferença (Tabela 10A) na espessura dos parênquimas paliçádicos e esponjosos. Foram verificadas as maiores médias para plantas aclimatizadas em Plantmax, com espessuras de 32,85 µm para parênquima paliçádico e 77,55 µm para esponjosos. As plantas produzidas *in vitro* apresentaram a menor média para a espessura do parênquima paliçádico (20,85 µm). Não houve diferença estatística quando comparadas as plantas aclimatizadas em vermiculita e areia e as produzidas *in vitro*, obtendo-se, no entanto, as menores médias para a espessura do parênquima esponjoso (Figura 18).



\* Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de barras, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

FIGURA 18 Espessura dos parênquimas paliçádicos e esponjosos de folhas de ipê-branco cultivados *in vitro* e aclimatizados em diferentes substratos por 30 dias.

#### 4 CONCLUSÕES

- Para aclimatização de plântulas de ipê-branco recomenda-se o uso de Plantmax como substrato.
- A relação DP/DE é menor nas folhas *in vitro* não aclimatizadas.
- A relação DP/DE é maior nas folhas aclimatizadas no substrato vermiculita.
- O mesofilo, a epiderme adaxial e abaxial e os parênquimas paliçádico e esponjoso apresentaram-se mais espessos nas folhas aclimatizadas no substrato Plantmax.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADÉ, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* de ipê-branco**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G. da; BARROS, C. F. Epiderme. In: APPEZZATO-DAGLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 87-108.

APÓSTOLO, N. M.; BRUTTI, C. B.; LLORENTE, B. E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cell Developmental Biological - Plant**, Columbia, v. 41, p. 307-313, May/June 2005.

BOLHAR-VORDENKAMPF, H. R.; DRAXLER, G. **Funcional leaf anatomy photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. 404 p.

BRASIL, E. C.; SILVA, A. M. B.; MULLER, C. H.; SILVA, G. R. da. Efeito da adubação nitrogenada e potássica e do calcário no desenvolvimento de mudas de aceroleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p.52-56, 1999.

CALVETE, E. O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv ampinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Passo Fundo.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 335-345, Apr.1981.

EL-BAHR, M. K.; ALI, Z. A.; TAHA, H. S. In vitro propagation of Egyptian date palm cv. Zaghlool: II. comparative anatomical studies between direct acclimatized and *in vitro* adapted (pre-acclimatized) plantlets. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, Cairo, v. 11, n. 2, p. 701-714, 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T. Embriogênese somática e organogênese indireta em *Pfaffia tuberosa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 993-995, 2007.

FERNANDES, C.; CORÁ, J. E. Caracterização físico-hídrica de substratos utilizados na produção de mudas de espécies olerícolas e florestais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 469-471, 2000. Suplemento.

GISLEROD, H. R. Physical conditions of propagation media and their influence on the rootins of cuttings: I. air content and oxygen diffusion at different moisture tensions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 69, n. 3, p. 445-456, Oct. 1982.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JÚNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 5. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 642 p.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; FRÁGUAS, C. 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, mar./abr. 2001.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Toledo: I. comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 237-257, jun. 1961.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian Hopea (dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, Apr. 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, p. 53.

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**, Berlin, v. 17, n. 1, p. 11-22, June 2003.

MENDONÇA, V.; ARAÚJO NETO, S. E. de; RAMOS, J. D.; PIO, R.; GONTIJO, T. C. A. Diferentes substratos e recipientes na formação de mudas de mamoeiro 'Sunrise Solo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 127-130, abr. 2003.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons (leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses)**. Oxford: Clarendon, 1950. v. 2, p. 1500.

MOREIRA, M. A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Pérola**. 2001. 81 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica : Ciência Agrária e Ambientais**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223-228, abr./jun. 2008.

OSÓRIO, M. L.; GONÇALVES, S.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Effects of CO<sub>2</sub> concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 49, n. 2, p. 161-167, June 2005.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.).

**Micropropagation: technology and application.** Dodrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”:** alterações morfoanatômicas. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SEDIYAMA, M. A. N.; GARCIA, N. C. P.; VIDIGAL, S. M. L.; MATOS, A. T. Nutrientes em compostos orgânicos de resíduos vegetais e dejetos de suínos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n. 1, p.185-189, jan./mar. 2000.

SOUZA, F. X. de. **Materiais para a formação de substratos na produção de mudas e cultivo de plantas envasadas.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 21 p. (Documento, 43).

SUTTER, E.; LANGHANS, R. W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, n. 12, p. 2896-2902, Dec. 1982.

VICHIATO, M.; SOUZA, M.; AMARAL, A. M.; MEDEIROS, M. R.; RIBEIRO, W. G. Desenvolvimento e nutrição mineral da tangerineira-cleópatra fertilizada com superfosfato simples e nitrato de amônio em tubetes até a repicagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n.1, p. 30-41, 1998.

## **ANEXOS**

## ANEXO A – TABELAS

TABELA 1A Análise de variância para a porcentagem de calos formados a partir de explantes de folhas cotiledonares de ipê-branco em diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e Picloram.

| FV          | GL | QM         |             |            |
|-------------|----|------------|-------------|------------|
|             |    | 2,4-D      | ANA         | Picloram   |
| Tratamentos | 4  | 5793.75*   | 10793,75*   | 13425*     |
| Erros       | 45 | 830.555556 | 1030,555556 | 838,888889 |
| Total       | 49 |            |             |            |
| CV (%) =    |    | 87,33      | 60,57       | 45,26      |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 2A Análise de variância para a porcentagem de calos formados a partir de explantes de hipocótilos de ipê-branco em diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e Picloram.

| FV          | GL | QM         |             |            |
|-------------|----|------------|-------------|------------|
|             |    | 2,4-D      | ANA         | Picloram   |
| Tratamentos | 4  | 14911.75*  | 10625*      | 16793.75*  |
| Erros       | 45 | 335.388889 | 1166.666667 | 415.277778 |
| Total       | 49 |            |             |            |
| CV (%) =    |    | 26.70      | 62.10       | 28.91      |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 3A Análise de variância para a porcentagem de calos formados a partir de explantes de raízes de ipê-branco em diferentes concentrações de 2,4-D, ANA e Picloram.

| FV          | GL | QM          |            |             |
|-------------|----|-------------|------------|-------------|
|             |    | 2,4-D       | ANA        | Picloram    |
| Tratamentos | 4  | 16000*      | 15918.75*  | 12768.75*   |
| Erros       | 45 | 1161.111111 | 409.722222 | 1369.444444 |
| Total       | 49 |             |            |             |
| CV (%) =    |    | 61.95       | 28.71      | 60.67       |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 4A Análise de variância para a porcentagem de coloração dos calos formados por diferentes explantes de ipê-branco cultivados *in vitro* por 30 dias.

| FV          | GL | QM        |               |
|-------------|----|-----------|---------------|
|             |    | Carmim    | Azul de Evans |
| Tratamentos | 2  | 0.411641* | 0.411641*     |
| Erros       | 72 | 0.033572  | 0.033572      |
| Total       | 74 |           |               |
| CV (%) =    |    | 57.64     | 26.86         |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 5A Análise de variância para a porcentagem de calos formados a partir de explantes de cotilédones, folhas cotiledonares, hipocótilo e raízes de ipê-branco em diferentes concentrações de TDZ.

| FV         | GL | QM          |                   |            |         |
|------------|----|-------------|-------------------|------------|---------|
|            |    | Cotilédones | Folhas cotiledon. | Hipocótilo | Raízes  |
| Tratamento | 4  | 5356.25*    | 1883.25*          | 3637.5*    | 3737.5* |
| Erros      | 45 | 313.888889  | 170.333333        | 195.833333 | 184.722 |
| Total      | 49 |             |                   |            |         |
| CV (%) =   |    | 53.69       | 65.92             | 47.44      | 51.29   |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 6A Análise de variância para o número de brotações formadas a partir de calos de ipê-branco em diferentes concentrações de TDZ.

| FV          | GL | QM       |
|-------------|----|----------|
| Tratamentos | 4  | 20.37*   |
| Erros       | 45 | 1.311111 |
| Total       | 49 |          |
| CV (%) =    |    | 75.33    |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 7A Análise de variância para densidade estomática do tecido epidérmico abaxial de lâminas foliares de ipê-branco cultivados *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos por 30 dias.

| <b>FV</b>   | <b>GL</b> | <b>QM</b>      |
|-------------|-----------|----------------|
| Tratamentos | 4         | 142979.090133* |
| Erros       | 70        | 1532.445562    |
| Total       | 74        |                |
| CV (%) =    |           | 22.36          |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 8A Análise de variância para o diâmetros polares (DP) e equatoriais (DE) e relação (DP/DE) de estômatos do tecido epidérmico abaxial de lâminas foliares de ipê-branco cultivados *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos por 30 dias.

| <b>FV</b>   | <b>GL</b> | <b>QM</b>   |             |                      |
|-------------|-----------|-------------|-------------|----------------------|
|             |           | <b>DP</b>   | <b>DE</b>   | <b>Relação DP/DE</b> |
| Tratamentos | 4         | 152.786250* | 196.155000* | 0.671507*            |
| Erros       | 70        | 10.751786   | 7.328571    | 0.047493             |
| Total       | 74        |             |             |                      |
| CV (%) =    |           | 11.34       | 14.46       | 13.73                |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 9A Análise de variância para a epiderme das faces adaxial e abaxial e mesofilo de folhas de ipê-branco cultivados *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos por 30 dias.

| <b>FV</b>   | <b>GL</b> | <b>QM</b>               |                         |                 |
|-------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
|             |           | <b>Epiderme adaxial</b> | <b>Epiderme abaxial</b> | <b>Mesofilo</b> |
| Tratamentos | 4         | 107.156250*             | 57.877200*              | 3398.692500*    |
| Erros       | 70        | 4.194643                | 6.174129                | 61.965000       |
| Total       | 74        |                         |                         |                 |
| CV (%) =    |           | 14.08                   | 17.86                   | 9.15            |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 10A Análise de variância para a espessura dos parênquimas paliçádicos e esponjosos de folhas de ipê-branco cultivados *in vitro* e aclimatizadas em diferentes substratos por 30 dias.

| FV          | GL | QM                    |                      |
|-------------|----|-----------------------|----------------------|
|             |    | Parênquima paliçádico | Parênquima esponjoso |
| Tratamentos | 4  | 280.057500*           | 1836.101250*         |
| Erros       | 70 | 11.012143             | 54.8775              |
| Total       | 74 |                       |                      |
| CV (%) =    |    | 12.69                 | 12.37                |

\*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste de F.