

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Centro de Ciências Agrárias  
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

**Morfogênese e Conservação *in vitro* para  
*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae)**

Taiza Cristina Higa

Florianópolis, SC

2006

**Morfogênese e Conservação *in vitro* para  
*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae)**

Taiza Cristina Higa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Florianópolis, SC

2006

## **AGRADECIMENTOS**

Minha gratidão...

Ao professor Dr. Enio Luiz Pedrotti, pela orientação, ensinamentos e entusiasmo, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À professora Dr. Ana Maria Viana, pela co-orientação, dedicação, paciência, estímulo e pelos conhecimentos generosamente compartilhados.

À professora Dr. Marisa Santos, pela preciosa colaboração e por disponibilizar gentilmente parte da infra-estrutura necessária para realização desse trabalho.

Aos professores Dr. Marcelo Maraschin e Dr. Aparecido Lima da Silva, pelas sugestões, auxílio e apoio durante o trabalho no Laboratório de Morfogêneses e Bioquímica Vegetal/UFSC.

À professora Dra. Marguerite Quoirin por ter aceitado participar da banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Ao colega Sérgio pelo auxílio e conhecimentos em métodos de estudos microscópicos.

Aos colegas Denílson e Alisson, que gentilmente me auxiliaram na coleta dos frutos e na montagem dos experimentos.

Ao funcionário Alencar, pela ajuda no monitoramento do ipê e à prefeitura do campus da universidade de Santa Catarina por disponibilizar o veículo hidráulico (Munck), imprescindível para as observações na copa da árvore.

À técnica de laboratório Luisa pelo tempo e auxílio na produção de fotos.

Aos colegas de laboratório, em especial à Carla, Liana, Luciano, Shirley, Dani, Luis, Marcelo, Fábio, Liliane, Mari e Fê, pela amizade, sugestões, alegrias e momentos agradáveis.

Ao coordenador do curso, professor Dr. Maurício Sedrez dos Reis e à secretária Bernadete Maria Possebon Ribas pela confiança e apoio durante a realização do trabalho.

A todos os professores do curso, que, da melhor forma, transmitiram os ensinamentos.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realização deste trabalho e a CAPES pelo auxílio financeiro.

E aos meus pais e a minha irmã pelo apoio e carinho.

## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	i
<b>Lista de Figuras</b> .....	ii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	iv
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	06
<b>FLORAÇÃO E FRUTIFICAÇÃO DE <i>Tabebuia heptaphylla</i> (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)</b> .....	09
1. INTRODUÇÃO.....	09
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1. Monitoramento da Floração e Frutificação.....	11
2.2. Marcação dos botões florais .....	11
2.3. Desenvolvimento do Fruto .....	11
3. RESULTADOS .....	13
4. DISCUSSÃO .....	20
5. CONCLUSÕES.....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
<b>GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO IN VITRO DE <i>Tabebuia heptaphylla</i> (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)</b> .....	26
1. INTRODUÇÃO .....	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
2.1. Preparação dos meios de culturas e reguladores de crescimento.....	28
2.2. Condições de cultura .....	28
2.3. Desinfestação e introdução de sementes imaturas <i>in vitro</i> .....	28
2.4. Desinfestação e introdução de sementes maduras <i>in vitro</i> .....	29
2.5. Comparação entre a germinação <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de sementes maduras.....	29
2.6. Determinação do Índice de Velocidade de Germinação.....	30

2.7. Desenvolvimento de plantas <i>in vitro</i> .....	30
3. RESULTADOS .....	31
3.1. Desinfestação e introdução de sementes imaturas <i>in vitro</i> .....	31
3.2. Desinfestação e introdução de sementes maduras <i>in vitro</i> .....	33
3.3. Germinação <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	34
3.4. Desenvolvimento de plantas <i>in vitro</i> .....	35
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
<b>CALOGÊNESE A PARTIR DE SEMENTES ZIGÓTICAS IMATURAS DE</b> <b><i>Tabebuia heptaphylla</i> (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)</b> .....	41
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1. Preparação dos meios de culturas e reguladores de crescimento.....	43
2.2. Condições de cultura.....	43
2.3. Indução de calos.....	43
2.4. Crescimento dos calos.....	44
3. RESULTADOS.....	45
3.1. Indução de calos.....	45
3.2. Crescimento dos calos.....	47
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
<b>EFEITO DE BAP (6-BENZILAMINOPURINA) E CIN</b> <b>(6-FURFURILAMINOPURINA) NA MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE</b> <b><i>Tabebuia heptaphylla</i> (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)</b> .....	53
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.1. Preparação dos meios de culturas e reguladores de crescimento.....	55
2.2. Condições de cultura .....	55
2.3. Histologia da região dos nós de caule de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	55

2.4. Cultura de segmentos caulinares.....	55
2.5. Cultura de raízes.....	57
3. RESULTADOS.....	58
3.1. Histologia da região dos nós de caule de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	58
3.2. Cultura de segmentos caulinares.....	58
3.3. Cultura de raízes.....	68
4. DISCUSSÃO.....	70
4.1. Morfogênese a partir de segmentos caulinares.....	70
4.2. Morfogênese a partir de segmentos radiculares.....	72
5. CONCLUSÕES.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
<b>EFEITO DO TIPO E DA IDADE DO EXPLANTE E DO NÚMERO DE SUBCULTURAS NA MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE <i>Tabebuia heptaphylla</i> (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)</b> .....	77
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
2.1. Preparação dos meios de culturas e reguladores de crescimento.....	79
2.2. Condições de cultura.....	79
2.3. Efeito do tipo e da idade do explante e da concentração de BAP na morfogênese <i>in vitro</i> .....	79
2.4. Efeito do número de subculturas na morfogênese <i>in vitro</i> .....	80
2.5. Efeito do tipo de explante cotiledonar e da concentração de BAP na morfogênese <i>in vitro</i> .....	80
3. RESULTADOS.....	82
3.1. Efeito do tipo e da idade do explante e da concentração de BAP na morfogênese <i>in vitro</i> .....	82
3.1.1. Morfogênese <i>in vitro</i> de explante removidos de plantas com 2 meses.....	82
3.1.2. Morfogênese <i>in vitro</i> de explantes removidos de plantas com 8 meses.....	86

3.1.3. <i>Morfogênese in vitro</i> de explantes removidos de plantas com 2 e 8 meses.....	89
3.1.3.a. Segmentos contendo a gema apical.....	89
3.1.3.b. Segmentos contendo o nó foliar.....	91
3.1.3.c. Segmentos contendo o nó cotiledonar.....	93
3.2. Efeito do tipo de explante e do número de subculturas na morfogênese <i>in vitro</i> .....	94
3.3. Efeito do tipo de explante cotiledonar e da concentração de BAP na morfogênese <i>in vitro</i> .....	97
4. DISCUSSÃO.....	100
4.1. Efeito do tipo e da idade do explante e da concentração de BAP na morfogênese <i>in vitro</i> .....	100
4.2. Efeito do tipo de explante e do número de subculturas na morfogênese <i>in vitro</i> .....	101
4.3. Efeito do tipo de explante cotiledonar e da concentração de BAP na morfogênese <i>in vitro</i> .....	103
5. CONCLUSÕES.....	104
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
<b>CONSERVAÇÃO IN VITRO E CRIOPRESERVAÇÃO DE <i>Tabebuia heptaphylla</i> (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)</b> .....	108
1. INTRODUÇÃO.....	108
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	111
2.1. Conservação de propágulos vegetativos <i>in vitro</i> .....	111
2.1.1. Encapsulamento em alginato de cálcio.....	111
2.1.2. Condições de armazenamento.....	111
2.1.3. Regeneração.....	111
2.2. Criopreservação de Sementes.....	112
2.2.1. Condições de armazenamento das sementes.....	112
2.2.2. Teor de água das sementes.....	112
2.2.3. Processo de criopreservação.....	112
2.2.4. Determinação do Índice de Velocidade de Germinação.....	113

3. RESULTADOS.....	114
3.1. Conservação de propágulos vegetativos <i>in vitro</i> .....	114
3.2. Criopreservação de sementes.....	114
4. DISCUSSÃO.....	117
4.1. Conservação de propágulos vegetativos <i>in vitro</i> .....	117
4.2. Criopreservação de Sementes.....	118
5. CONCLUSÕES.....	119
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>125</b>
Apêndice A.....	125
Apêndice B.....	126
Apêndice C.....	127
Apêndice D.....	128
Apêndice E.....	129
Apêndice F.....	130
Apêndice G.....	131
Apêndice H.....	132
Apêndice I.....	133
<b>Anexo .....</b>	<b>134</b>



## Lista de Abreviaturas

- 2,4-D** – Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético  
**ABA** – Ácido Abscísico  
**ANA** – Ácido Naftalenoacético  
**B5** – Meio de cultura estabelecido por Gamborg, Miller e Ojima (1968)  
**BAP** – 6-Benzilaminopurina  
**CCA** – Centro de Ciências Agrárias  
**CCB** – Centro de Ciências Biológicas  
**CIN** – 6-Furfurilaminopurina (cinetina)  
**DAP** – Diâmetro à altura do peito  
**EPAGRI** – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
**g** – grama  
**AIA** – Ácido indol-3-acético  
**IVG** – Índice de velocidade de germinação  
**L** – Litro  
**M** – Molar  
**mg** – Miligrama  
**ml** – Mililitro  
**mm** – Milímetro  
**MS** – Meio de cultura basal estabelecido por Murashige e Skoog (1962)  
**MS/2** – Meio de cultura com a metade da concentração salina estabelecida por Murashige e Skoog (1962)  
**NaOH** – Hidróxido de sódio  
**+NL** – Criopreservado  
**-NL** – Não criopreservado  
**Picloram** – Ácido 4-amino-3,4,6-tricloro-picolínico  
**s** – segundo  
**SC** – Santa Catarina  
**SP** – São Paulo  
**UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina  
**WPM** – (Woody Plant Medium). Meio de cultura estabelecido por Lloyd e McCown (1981)  
**µM** - Micromol

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Marcadores utilizados para monitorar a floração e a frutificação de árvore de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	12
<b>Figura 2</b>	Veículo hidráulico (Munck) utilizado no processo de marcação dos botões florais e monitoramento do desenvolvimento das flores e frutos de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	12
<b>Figura 3</b>	Médias mensais de temperatura e umidade relativa entre maio a outubro de 2004.....	13
<b>Figura 4</b>	Desenvolvimento da inflorescência de <i>Tabebuia heptaphylla</i> , no período de junho e agosto de 2004.....	14
<b>Figura 5</b>	Médias mensais de temperatura e umidade relativa entre maio e outubro de 2005.....	15
<b>Figura 6</b>	Desenvolvimento da inflorescência de <i>Tabebuia heptaphylla</i> , nos meses de julho e agosto de 2005.....	16
<b>Figura 7</b>	Frutos imaturos de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	18
<b>Figura 8</b>	Comprimento e diâmetro dos frutos de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 45, 55, 60, 65 e 70 dias após a abertura dos botões florais, coletadas no município de Florianópolis-SC, nos meses de agosto e setembro de 2004.....	19
<b>Figura 9</b>	Massa fresca e seca e teor de água de frutos de <i>Tabebuia heptaphylla</i> em diferentes estágios de desenvolvimento, coletadas no município de Florianópolis/SC, nos meses de agosto e setembro de 2004.....	19
<b>Figura 10</b>	Sementes maduras de <i>Tabebuia heptaphylla</i> (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae).....	29
<b>Figura 11</b>	Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Tabebuia heptaphylla</i> em meio MS/2, submetidas ao processo de desinfestação com imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 e 30 minutos.....	33
<b>Figura 12</b>	Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Tabebuia heptaphylla</i> em meio MS submetidas ao processo de desinfestação em hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos e germinação <i>ex vitro</i> de sementes sob papel filtro embebido em água destilada...	34

<b>Figura 13</b>	Plantas de <i>Tabebuia heptaphylla</i> , oriundas de sementes maduras, crescidas <i>in vitro</i> .....	35
<b>Figura 14</b>	Calos originados a partir de sementes imaturas de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	47
<b>Figura 15</b>	Desenho esquemático de planta crescida <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	56
<b>Figura 16</b>	Corte longitudinal do caule de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 70 dias de idade.....	58
<b>Figura 17</b>	Plântula de <i>Tabebuia heptaphylla</i> crescida <i>in vitro</i> com 7 dias de idade (indicações das incisões do cotilédone).....	81
<b>Figura 18</b>	Cultura de segmentos nodais foliares de <i>Tabebuia heptaphylla</i> , em meio de cultura MS suplementado com BAP, após 70 dias de cultivo.....	83
<b>Figura 19</b>	Teor de água de sementes de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 20, 26, 105 e 120 semanas após a coleta, armazenadas em sacos plásticos, na geladeira a 5 <sup>o</sup> C.....	115

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Frutos de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 45, 50, 60, 65 e 70 dias após a abertura dos botões florais, coletados no município de Florianópolis/SC, nos meses de agosto e setembro de 2004.....	17
<b>Tabela 2</b>	Germinação máxima <i>in vitro</i> de embriões imaturos oriundo de frutos com 70, 65, 60 e 55 dias após a floração (contados a partir da visualização dos botões florais), em meio WPM suplementado com BAP nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16 $\mu$ M.....	32
<b>Tabela 3</b>	Desenvolvimento de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 15, 30 e 70 dias de idade.....	35
<b>Tabela 4</b>	Formação de calos a partir de sementes imaturas de <i>Tabebuia heptaphylla</i> em meio de cultura WPM, suplementado com 2,4-D nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16 $\mu$ M.....	46
<b>Tabela 5</b>	Formação de calos a partir de sementes imaturas de <i>Tabebuia heptaphylla</i> em meio de cultura WPM, suplementado com Picloram nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16 $\mu$ M.....	46
<b>Tabela 6</b>	Diâmetro dos calos (mm) formados a partir de embriões imaturos com 55 dias de idade de <i>Tabebuia heptaphylla</i> , com 0, 7, 14 e 21 dias de idade em meio gelificado WPM suplementado com 0, 2, 4, 8 e 16 $\mu$ M de 2,4-D.....	48
<b>Tabela 7</b>	Efeito do BAP e CIN em diferentes concentrações, após 60 dias de cultura <i>in vitro</i> , na porcentagem de explantes oxidados.....	59
<b>Tabela 8</b>	Respostas morfogênicas de segmentos caulinares contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares, com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultura em meio MS contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.....	61
<b>Tabela 9</b>	Massa fresca e seca e o teor de água da cultura de segmentos caulinares contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultura em meio MS contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.....	63

<b>Tabela 10</b>	Número de brotos por explante, obtido a partir da cultura de segmentos caulinares, contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares, com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de BAP e CIN...	65
<b>Tabela 11</b>	Comprimento do broto e o número de nós dos brotos originados da cultura de segmentos caulinares contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações de BAP e CIN..	67
<b>Tabela 12</b>	Respostas morfogênicas (%) obtidas a partir da cultura de raízes excisadas de plantas produzidas <i>in vitro</i> com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.....	69
<b>Tabela 13</b>	Respostas morfogênicas de segmentos apicais, foliares e cotiledonares de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 2 meses de idade, após 70 dias de cultura em meio MS, suplementado com BAP.....	83
<b>Tabela 14</b>	Massa fresca total dos brotos e dos calos, após 70 dias de cultura em meio MS suplementado com BAP, originadas de segmentos nodais de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com aproximadamente 2 meses de idade.....	85
<b>Tabela 15</b>	Número de brotos, comprimento do maior broto e número de nós originados de segmentos nodais, apicais, foliares e cotiledonares de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 2 meses de idade, após 70 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP.....	86
<b>Tabela 16</b>	Respostas morfogênicas de segmentos nodais apicais, foliares e cotiledonares de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 8 meses de idade, após 70 dias de cultura <i>in vitro</i> em meio MS, suplementado com BAP.....	87
<b>Tabela 17</b>	Massa fresca total, dos brotos e dos calos, após 70 dias de cultivo em meio MS com BAP, originadas de segmentos nodais de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com aproximadamente 8 meses ....	88

<b>Tabela 18</b>	Número de brotos por explantes, comprimento do maior broto e número de nós, originados de segmentos nodais apicais, foliares e cotiledonares de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com aproximadamente 8 meses de idade, após 70 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP.....	89
<b>Tabela 19</b>	Efeito da idade do explante e da concentração de BAP no comprimento do broto originados da cultura <i>in vitro</i> de segmentos nodais apicais, de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 2 e 8 meses de idade.....	90
<b>Tabela 20</b>	Morfogênese de segmentos nodais apicais de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 2 e 8 meses de idade, após 70 dias de cultivo, em meio MS suplementado com BAP.....	91
<b>Tabela 21</b>	Morfogênese de segmentos nodais foliares de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 2 e 8 meses de idade, após 70 dias de cultivo, em meio MS suplementado com BAP.....	92
<b>Tabela 22</b>	Morfogênese de segmentos nodais cotiledonares de plantas <i>in vitro</i> de <i>Tabebuia heptaphylla</i> com 2 e 8 meses de idade, após 70 dias de cultivo, em meio MS suplementado com BAP.....	94
<b>Tabela 23</b>	Respostas morfogênicas obtidas a partir da cultura de explantes de segmentos caulinares de <i>Tabebuia heptaphylla</i> , contendo os nós apicais ou foliares, durante a primeira, segunda e terceira subcultura.....	95
<b>Tabela 24</b>	Massa fresca total e dos calos, número de brotos por explantes e comprimento do maior broto obtido a partir da cultura de explantes de segmentos caulinares de <i>Tabebuia heptaphylla</i> , contendo os nós apicais ou foliares, da primeira, segunda e terceira subcultura...	96
<b>Tabela 25</b>	Efeito do número de subculturas na massa fresca dos brotos e no número de nós dos brotos obtidos a partir da cultura de segmentos caulinares contendo os nós apicais ou foliares de <i>Tabebuia heptaphylla</i> .....	97

<b>Tabela 26</b>	Efeito de BAP em diferentes concentrações, após 60 dias, na expansão dos tecidos (em volume) de cotilédones inteiros ou segmentos de cotilédones excisados de plantas <i>in vitro</i> com 2 meses de idade.....	98
<b>Tabela 27</b>	Efeito de BAP em diferentes concentrações, após 60 dias, na formação de calos e brotos e na porcentagem de oxidação de cotilédones inteiros ou segmentos de cotilédones excisados de plantas <i>in vitro</i> com 2 meses de idade.....	99
<b>Tabela 28</b>	Porcentagem de regeneração em meio MS com 1,11 $\mu\text{M}$ de BAP, de segmentos contendo a gema apical ou os nós foliares e cotilédones, encapsulados em alginato de cálcio e armazenados por 6 meses em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ).....	114
<b>Tabela 29</b>	Germinação máxima (%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes armazenadas em geladeira por 22, 26, 105 e 120 semanas, criopreservadas (+NL) e não criopreservadas (-NL) por 60 minutos.....	116

## RESUMO

*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae) (ipê-roxo-de-sete-folhas) é uma espécie nativa da Mata Atlântica, de importância ornamental, medicinal, no reflorestamento e na produção de madeira. Esta espécie produz sementes cuja viabilidade é reduzida drasticamente após poucos meses de armazenamento (3-15 meses). Sua propagação é tradicionalmente efetuada através de sementes, sendo assim limitada pelas dificuldades de coleta e pelo restrito potencial de armazenamento. Assim, visando ampliar o conhecimento sobre a espécie e abrir novas perspectivas para a propagação e conservação, o objetivo desse trabalho foi estudar o comportamento da *T. heptaphylla* na sua fase reprodutiva e quantificar suas respostas morfogênicas em cultura *in vitro*. O monitoramento do período de floração e frutificação da *Tabebuia heptaphylla* no ano de 2004 e 2005, indicou que o início da fase reprodutiva da espécie está relacionado às condições climáticas do ambiente e que as alterações climáticas em 2005 podem ter induzido a baixa frutificação neste ano. Essas alterações no clima, podem ter reduzido tanto a quantidade e qualidade fisiológica dos órgãos reprodutivos, como a eficiência da polinização. O tempo de desenvolvimento do fruto foi de aproximadamente 80 dias e a antecipação de sua coleta resultou em baixa porcentagem de germinação. O uso de BAP, contudo mostrou efeito positivo na germinação de sementes imaturas. A presença de auxina (2,4-D e Picloran) afetou positivamente na produção de calos a partir de sementes imaturas. Um protocolo de micropropagação foi desenvolvido usando segmentos de caule de *T. heptaphylla* contendo as gemas apicais, nós foliares e cotiledonares, sendo que o uso de BAP no meio de cultura, na maioria dos tratamentos, foi mais efetivo na micropropagação que a adição de CIN nas mesmas concentrações. A idade do explante afetou as respostas morfogênicas. Em segmentos nodais foliares e cotiledonares, houve uma tendência de maior formação de calos e brotos em explantes advindos de plantas *in vitro* mais novas (2 meses de idade). Os explantes de *T. heptaphylla* demonstraram uma tendência de diminuir a formação de calos e brotos, após sucessivas subculturas, indicando uma perda gradativa no seu potencial morfogênico. Na conservação de propágulos vegetativos *in vitro*, os segmentos caulinares encapsulados em alginato de cálcio, contendo a gema apical, e os nós foliares e cotiledonares não mantiveram a sua viabilidade após 6 meses de armazenamento. Quanto a criopreservação de



sementes de *T. heptaphylla*, a capacidade de germinação foi influenciada pela interação dos fatores: tempo de armazenamento e exposição ao nitrogênio líquido, sendo que as sementes armazenadas por 26 e 105 semanas não foram afetadas pela criopreservação. Sementes com 120 semanas de armazenamento tiveram sua porcentagem de germinação incrementada após a criopreservação.

**Palavras-chaves:** *Tabebuia heptaphylla*, ipê, floração, frutificação, cultura *in vitro*, calogênese, micropropagação, conservação *in vitro*, criopreservação.

## ABSTRACT

*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae) (pink trumpet tree) is an important native species of Atlantic Forest. It is known for its ornamental, economic and medicinal importance. The species produces seeds whose viability is reduced drastically after a few months of storage (3-15 months). Their propagation is traditionally effected through seeds, limited by difficulties of collection and their limited potential of storage. So, to enlarge the knowledge about the species and to open new perspectives for the propagation and conservation, the objective of this work was to study the behavior of *T. heptaphylla* in a reproductive phase and quantify the morphogenetic answers in tissue culture. The measurements of period of flowering and fruiting of *T. heptaphylla* in 2004 and 2005 indicated that the beginning of the reproductive phase has a correlation to the environmental climatic conditions. The results show that the climatic alterations in 2005, probably had induced the low fruiting in this year. These climatic alterations could have reduced the quantity and physiologic quality of the reproductive organs, and reduced the efficiency of the pollination. The fruit development period was approximately 80 days and the seeds collected anticipated turned in low percentage of germination. The use of BAP showed positive effect in the germination of immature seeds. The presence of auxins (2,4-D and Picloram) increases callus production from immature seeds. A protocol of micropropagation was developed using shoot tips and nodal explants. BAP was more effective than CIN in micropropagation. The morphogenetic answer was affected by the age of explants. In nodal explants there was a tendency of the higher percent of callus and shoot from young *in vitro* plant. For that species, there was a tendency of reducing the formation of callus and shoot after successive subcultures. These results indicated a gradual loss of potential morphogenetic. The encapsulated nodal explants, *in vitro* conservation, lost their viability after six months of storage. The results show that the capacity of germination in *T. heptaphylla* seeds was influenced by the interaction of the factors: time of storage and cryopreservation. Seeds with 120 weeks of storage had increased their percentage of germination.

**Keywords:** *Tabebuia heptaphylla*, pink trumpet tree, flowering, fruiting, tissue culture, micropropagation, *in vitro* conservation, cryopreservation.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui uma grande biodiversidade, abrangendo cerca de 15 a 20% do número total de espécies do nosso planeta, sendo portador da maior diversidade genética vegetal do mundo (Vilela-Morales e Valois, 2000; Ministério do Meio Ambiente, 2004; Ibama, 2004). Essa megadiversidade biológica, por representar uma grande fonte de recursos vegetais, como madeira, frutas, fibras, produtos medicinais, plantas ornamentais, resinas, óleos essenciais, pigmentos, cosméticos, inseticidas e repelentes naturais, tem despertado interesse em vários setores da sociedade (Rizzini *et al.*, 1998; Schaffer e Prochnow, 2002). Porém, ainda há uma carência de informações científicas para subsidiar planos e ações de conservação da diversidade genética (Barbedo *et al.*, 2002).

A Mata Atlântica está entre os biomas brasileiros de maior biodiversidade, abrigando mais de 50.000 espécies vegetais, cerca de 22% do total mundial, muitas delas endêmicas (Vilela-Morales e Valois, 2000; Ministério do Meio Ambiente, 2004). Devido à sua grande diversidade vegetal, está incluída entre os cinco maiores ecossistemas do mundo, em número de espécies (Joly *et al.*, 1999) e detêm o recorde mundial de diversidade botânica para plantas lenhosas, com 458 espécies em um hectare do sul da Bahia (Ministério do Meio Ambiente, 2004; Schaffer e Prochnow, 2002).

Apesar da riqueza que a Mata Atlântica representa, a devastação desse bioma tem sido intensa e suas espécies têm sido rapidamente exauridas, o que alterou grande parte do seu ecossistema natural, reduzindo-o a menos de 7,3% de sua extensão original, que era de 1.360.421 km<sup>2</sup>, na época do descobrimento (Ministério do Meio Ambiente, 2004; Shaffer e Prochnow, 2002).

A devastação da Mata Atlântica, segundo o Ministério do Meio Ambiente (2004), é um reflexo da ocupação e da exploração desordenada de seus recursos naturais. Vários fatores abióticos contribuíram para o desmatamento, como a contínua e intensiva extração de madeira, a expansão da agricultura e o crescimento populacional e industrial. Além disso, fatores bióticos também têm interferido na regeneração natural da mata, como a floração esporádica e a baixa viabilidade das sementes (Carvalho, 1994; Viana *et al.*, 1999).

Devido a sua riqueza biológica e ao alto grau de ameaça, a Mata Atlântica, segundo Ministério do Meio Ambiente (2004), tem sido considerada um dos “hot spots” mundiais, ou seja, uma das prioridades para conservação.

Uma espécie de grande importância econômica, ecológica e medicinal, nativa da Mata Atlântica é a *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae), popularmente conhecida como: cabroé, graraíba, ipê-piranga, ipê-preto, ipê-rosa, ipê-roxo, ipê-roxo-anão, ipê-roxo-de-sete-folhas, ipê-uva, pau-d’arco, peúva e píuva.

Suas árvores, apresentam geralmente 10 a 20 metros de altura e 30 a 60 centímetros de DAP, sendo utilizada com sucesso em reflorestamentos mistos (Carvalho, 1994).

A espécie apresenta flores digitaliformes, com 5 a 8 cm de comprimento e coloração que varia do roxo a rosa. Seus frutos são síliquas com comprimento de 20 a 35 cm e 1,5 cm de diâmetro, contendo sementes aladas com aproximadamente 20 mm de comprimento e 7 mm de largura (Carvalho, 1994).

A planta tem um grande potencial ornamental, sendo largamente empregada em praças, jardins e arborização de ruas, avenidas e alamedas. Antes da floração, as árvores perdem as folhas e produzem flores em abundância (Rizzini, 1976).

A árvore de *T. heptaphylla* possui madeira de excelente qualidade, de alta densidade, dura, com grande resistência e maleabilidade, produz carvão de boa qualidade e é amplamente empregada na construção civil, como vigas, caibros e assoalhos. Sendo ainda utilizada em obras externas como mourões, pontes e dormentes e na confecção de carrocerias e bengalas (Carvalho, 1994; Lorenzi, 1998).

Alguns estudos têm relatado propriedades medicinais a espécie. A atividade anticancerígena da casca do ipê é atribuída principalmente às naftoquinonas lapachol e hidro- $\alpha$ -lapachona, que apresentaram *in vitro* um efeito inibidor sobre o crescimento de tumores malignos, além de outras propriedades farmacológicas, como a atividade analgésica, antiinflamatória, anticoagulante, antimalárica e antianêmica (Rizzini, 1976; Teske e Trentini, 1997; Falkenberg, 1999).

Machado *et al.* (2003) reportaram a atividade antimicrobiana de extratos e frações de plantas de ipê-roxo, relatando que as naftoquinonas são as principais componentes responsáveis por essa ação, configurando uma boa opção para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento às infecções bacterianas, já

tendo demonstrado eficiência no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*.

As folhas da *Tabebuia heptaphylla* são popularmente empregadas no caso de úlceras gástricas e duodenais e o chá da entrecasca é muito utilizado contra gripes. O ipê-roxo também é indicado no tratamento de gastrite, estomatite, bronquite e asma (Carvalho, 1994; Teske e Trentini, 1997).

Devido à importância ecológica, econômica e medicinal da *T. heptaphylla*, faz-se necessário, a elaboração de estratégias de propagação e conservação dessa espécie. Além disso, Carvalho (1994) aponta a necessidade de estabelecimento de programas de conservação para espécies nativas da Mata Atlântica como a *T. heptaphylla*.

Segundo Viana *et al.* (1999), os estudos básicos sobre cultura *in vitro* e biotecnologia da conservação, são as bases para o estabelecimento de estratégias de conservação de espécies nativas brasileiras, a curto, médio e longo prazo.

As técnicas de cultura *in vitro* possibilitam a obtenção de plantas inteiras a partir de células isoladas, de tecidos e de órgãos. Constituindo assim, uma alternativa para conservação de espécies propagadas vegetativamente ou com sementes de baixo potencial de armazenamento (Pence, 1999).

Uma dessas técnicas de cultura *in vitro*, a micropropagação, tem sido estudada há vários anos. Inicialmente em espécies de interesses agrícolas, mas gradualmente tem sido aplicada em espécies arbóreas florestais (Pence, 1999). Porém o número de espécies de árvores brasileiras nativas estudadas em relação a micropropagação, é ainda pequeno. *Centrolobium tomentosum*, *Jacquinia brasiliensis*, *Melanoxylon brauna*, *Rapanea ferruginea*, *Schizolobium parayba*, *Zeyhera tuberculosa*, *Carinia legalis*, *Cordia trichotoma*, *Paratecoma peroba*, *Phathymenia foliolosa*, *Virola gardineri*, *Caryocar brasiliense*, *Eugenia dysenterica*, *Pterodon pubescens*, *Dalbergia miscolobium* *Aspidosperma sp.*, *Miconia sp.* *Maurita flexuosa* são alguns exemplos (Teixeira, 2004).

A micropropagação apresenta algumas vantagens como as altas taxas de multiplicação, produção de matrizes livres de patógenos e pouca demanda de espaço físico. No entanto, a técnica apresenta como ponto negativo, a necessidade de freqüentes subculturas, o que acarreta no aumento da probabilidade de contaminação e de variação somaclonal.

Para evitar esses problemas, foram desenvolvidas técnicas de conservação *in vitro* através da restrição de crescimento, com aplicação de estratégias como a redução da temperatura de incubação das culturas e a aplicação de retardantes osmóticos e hormonais no meio de cultura. Porém, os estudos, apontam para o desenvolvimento de sistemas de conservação *in vitro* somente por curtos períodos (Hartmann *et al.*, 1990; Withers e Williams, 1998; Santos, 2000).

A conservação a médio e longo prazo tem sido obtida por técnicas de criopreservação. Segundo Santos (2000) esta é a única técnica capaz de manter a estabilidade genética e biológica por um longo período de armazenamento.

A criopreservação, definida por Kartha (1985 *apud* Santos, 2000) como a conservação de material biológico em temperaturas ultrabaixas,  $-196^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido, ou  $-150^{\circ}\text{C}$  na fase vapor de nitrogênio, desacelera os processos metabólicos tornando-os praticamente inativos, o que resulta na conservação do material. Um número grande de plantas de importância econômica tem sido criopreservadas com sucesso, como: *Allium sativum* L., *Solanum* ssp., *Ipomea batatas* L., *Manihot esculenta* Crantz, *Triticum* spp., *Zea mays* L., *Saccharum officinale* L., *Dianthus caryophyllus* L., *Chrysanthemum* spp., *Musa* spp., *Citrus sinensis* L. Osb., *Malus* spp., *Fragaria* spp., *Pyrus communis* L. *Vitis vinifera* L., *Arachis hypogea* L., *Cocos nucifera* L., *Cicer* spp., *Olea europea* L., *Coffea arábica* L. e *Camellia sinensis* L. O. Kuntze (Santos, 2000).

Essa técnica, aparentemente, resolve os problemas associados à manutenção de culturas, porém, apresenta outros problemas associados aos processos de congelamento e descongelamento (Withers e Williams, 1998; Benson, 1999). A exposição do material biológico a baixas temperaturas pode causar danos as células principalmente pela formação de cristais de gelo em seu interior (Hopkins, 1999). Segundo Withers e Williams (1998), cada sistema de cultura reage de forma diferente a criopreservação, o que torna necessário o desenvolvimento de uma metodologia específica para cada tipo de cultura.

Os recursos genéticos vegetais apresentam um grande potencial para produção sustentável de gêneros essenciais, como alimentos, fibras e medicamentos. Entretanto, esse reservatório natural de genes vem diminuindo devido à exploração sem controle dos seus ecossistemas e seus recursos naturais (Santos, 2000). Assim, a conservação genética e a propagação de espécies florestais, através do conhecimento da biologia reprodutiva da espécie e de técnicas

de cultura *in vitro* e da criopreservação são essenciais para a preservação desses recursos genéticos, principalmente das espécies florestais nativas presentes em ecossistemas ameaçados, como a Mata Atlântica (Haines, 1994; Gonzalez-Benito *et al.*, 1999).

Portanto, visando o estabelecimento de sistemas de micropropagação e conservação da *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae), esse trabalho teve como objetivo, estudar o comportamento da espécie na fase reprodutiva, quantificar as respostas morfogenéticas em culturas *in vitro* e verificar a tolerância das sementes ao processo de criopreservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBEDO, C.J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 25, n. 4, p. 431-439, 2002.

BENSON, E. E. Cryopreservation. In: BENSON, E. E. (Ed.) - **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor & Francis, cap. 6, p. 83-95, 1999.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília, D.F.: Embrapa-SPI, 639p., 1994.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ UFSC, 1999.

GONZALEZ-BENITO, M. E.; MARTÍN, C.; IRIONDO, J. M.; PÉREZ, C. Conservation of the rare and endangered plants endemic to Spain. In: BENSON, E. E. (Ed) – **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor & Francis. p. 251-264, 1999.

HAINES.R. **Biotechnology in forest tree improvement with special reference to developing countries**. Rome, FAO/IBPGR, 1994. 230p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T. **Plant Propagation: Principles and Practices**. New Jersey: Prentice Hall, 1990. 633p.

HOPKINS,W. G. **Introduction to Plant Physiology**. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1999.

IBAMA. **Conservação e Manejo sustentável da Flora Nativa do Brasil**. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em 09 de março de 2004.



JOLY, C.A., AIDAR, M.P.M., KLINK, C.A., MCGRATH, D.G., MOREIRA, A.G., MOUTINHO, P., NEPSTAD, D.C., OLIVEIRA, A.A., POTT, A., RODAL, M.J.N. & SAMPAIO, E.V.S.B. Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. **Ciência e Cultura**, v. 51 p. 331-348. 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2ed. São Paulo: Plantarum, v. 1, 1998. 352p.

MACHADO, T., B.; PINTO, A. V.; PINTO, PINTO M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. F. KUSTER, R. M.; NETTO-DOS-SANTOS, K. R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 279-284, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade Brasileira**. Brasília: MMA/SBF, 2004. 398p.

PENCE, V. C. The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. In: **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor & Francis, cap. 6, p. 83-95, 1999.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU, Ed. da Universidade de São Paulo, 1976.

RIZZINI, C. T.; COIMBRA FILHO, A. F.; HOUAISS, A. **Ecosistemas brasileiros**. Index, 1988. 200p.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e Perspectivas para a Conservação de Germoplasma Vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (edição especial) p. 70-84, 2000.

SCHAFFER, W. B.; PROCHNOW, M. **A Mata Atlântica e você: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira**. Brasília: APREMAVI, 156p., 2002.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Disponível em: < <http://www.embrapa.br>>. Acesso em 09 de março de 2004.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba. 317p., 1997.

VIANA, A. M.; MAZZA, M. C.; MANTELL, S. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain forests. In: BENSON, E. E. **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor & Francis, cap. 18, p. 277-299, 1999.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C. Recursos Genéticos Vegetais autóctone e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.17, n.2 , p. 11-42, 2000.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 297-330, 1998.

## FLORAÇÃO E FRUTIFICAÇÃO DE *Tabebuia heptaphylla* (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)

### 1. INTRODUÇÃO

A família Bignoniaceae é predominantemente tropical, de ampla distribuição na Mata Atlântica, sendo o Brasil, segundo Schultz (1984), o seu maior centro vegetativo. Possui cerca de 120 gêneros e aproximadamente 800 espécies, entre árvores, arbustos e cipós com gavinhas foliares (Schultz 1984, Joly 1997).

Uma espécie de grande importância, representante dessa família é a *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae), conhecida por seus nomes populares: ipê-rosa, ipê-roxo-de-sete-folhas, pau-d'arco e píuva; é chamado por Rizzini (1976), de árvore nacional.

Na década de 60 e 70, a fama propagada, atribuindo a propriedade antitumoral aos extratos à base de casca de ipê-roxo, quase colocou a espécie em risco de extinção. Milhares de exemplares tiveram suas cascas retiradas, e com isso seu tecido cambial removido, o que resultava na morte da planta (Rizzini 1976, Falkenberg 1999).

O sistema reprodutivo da *Tabebuia heptaphylla* ainda não foi descrito, sendo porém, parcialmente conhecido para algumas espécies do gênero, como a *Tabebuia pulcherrima* (Sandwith), descrita como alógama facultativa por Souza (2004); a *T. áurea* (Manso) Benth & Hook, descrita como predominantemente alógama, apresentando auto-incompatibilidade e sem apomixia (Barros, 2001); a *T. ochracea* (Charm.) Standl., é relatada como alógama, auto-incompatível e com uma certa taxa de apomixia, sistema semelhante a *T. chrysotricha* (Mart. Ex Dc.) Standl. (Barros, 2001; Costa *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005).

A floração da *Tabebuia heptaphylla* em Santa Catarina, se dá de janeiro a julho, mas a espécie, no Brasil, floresce de janeiro a setembro, florescendo na Bahia em fevereiro, no Paraná em setembro, no Rio de Janeiro e em São Paulo de junho a setembro, no Mato Grosso do sul em julho, no Espírito Santo e em Mato Grosso em agosto e no Rio Grande do Sul em setembro (Carvalho, 1994).

A frutificação inicia-se em árvores com 5 a 7 anos de idade e os frutos maduros podem ser observados nos períodos de julho a dezembro.

A fase reprodutiva é o período em que a planta está mais suscetível às variações do ambiente. Fatores como o fotoperíodo, a umidade e a temperatura, podem estar envolvidos nas variações apresentadas pelas florações e frutificações de um ano para o outro. Assim, o conhecimento dos padrões de florescimento e de frutificação de uma espécie é fundamental para compreender o seu processo reprodutivo (Pereira-Netto, 2002; Taiz e Zeiger, 2004).

Apesar da *T. heptaphylla* ter despertado grande interesse na sociedade, devido a sua importância econômica, ecológica e medicinal, o número de artigos científicos publicados referentes à biologia reprodutiva da espécie ainda é reduzido.

Segundo Viana *et al.*, (1999) a produção comercial e regeneração artificial de áreas degradadas são limitadas pela falta de conhecimento disponível sobre a ecologia e a biologia reprodutiva das espécies. Assim, programas de regeneração têm sido desenvolvidos para um número reduzido de espécies nativas brasileiras (Carvalho 1994, Viana *et al.* 1999). Isso torna o Brasil, altamente dependente dos produtos exóticos, apesar de toda a sua riqueza biológica.

Deste modo, o presente trabalho procurou descrever o comportamento da *Tabebuia heptaphylla*, na fase reprodutiva e estabelecer os fatores ambientais que podem estar envolvidos nas variações apresentadas pelas florações e frutificações de um ano para outro.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Monitoramento da Floração e Frutificação

Visando acompanhar a fase reprodutiva da *Tabebuia heptaphylla*, foi realizado o monitoramento da floração e frutificação de uma árvore dessa espécie, localizada no município de Florianópolis/SC, por um período de 2 anos. Esse trabalho foi realizado através da marcação dos botões florais, a partir de 0,5 cm de diâmetro e observação do desenvolvimento das flores e dos frutos, até o início de sua maturação (coloração cinzento-ferrugíneo e fendilhamento lateral). O material botânico foi coletado e depositado no Herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina (s/n, 2004).

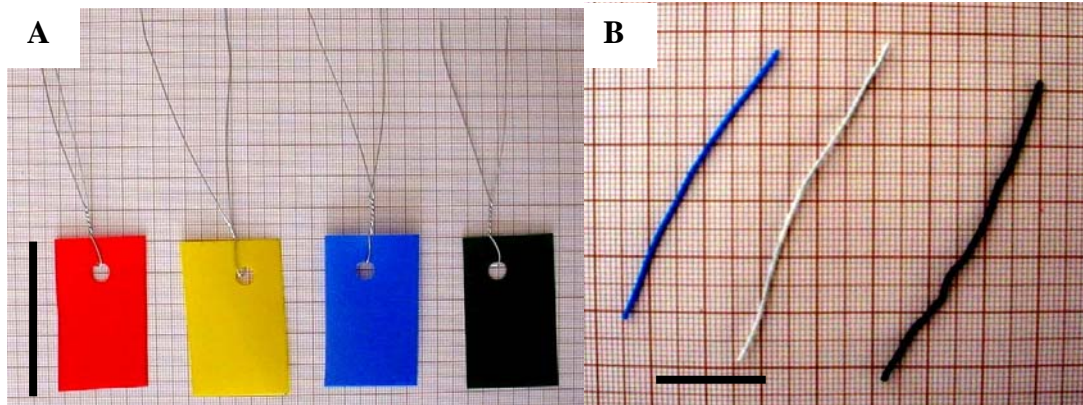
### 2.2. Marcação dos botões florais

A marcação dos botões florais foi realizada em intervalos de 5 dias, nos meses de junho de 2004; e julho e agosto de 2005, com a utilização de etiquetas coloridas (**Figura 1**) e o desenvolvimento das flores e dos frutos foi monitorado a cada 3 dias. O processo de marcação e monitoramento foi realizado com o auxílio do veículo hidráulico (Munck), cedido pela prefeitura da Universidade Federal de Santa Catarina (**Figura 2**). Neste trabalho, os botões florais foram considerados, apenas quando estes atingiram diâmetro superior a 0,5 cm, sendo facilmente visualizados.

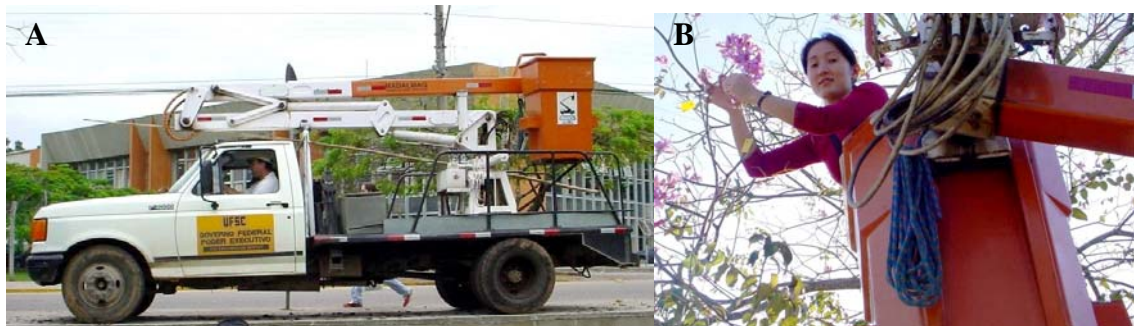
### 2.3. Desenvolvimento do Fruto

Após o início da frutificação, foram coletados frutos em diferentes estágios de desenvolvimento, identificados pelos marcadores e classificados quanto à idade (dias após a abertura do botão floral). Os frutos coletados foram avaliados quanto ao comprimento, diâmetro, massas fresca e seca e teor de água.

Foram utilizados 10 frutos para cada estágio de desenvolvimento.



**Figura 1.** Marcadores utilizados para monitorar a floração e a frutificação de árvore de *Tabebuia heptaphylla*. (A) Marcadores das inflorescências. Barra = 5 cm. (B) Marcadores individuais para cada flor da inflorescência. Barra = 2 cm.



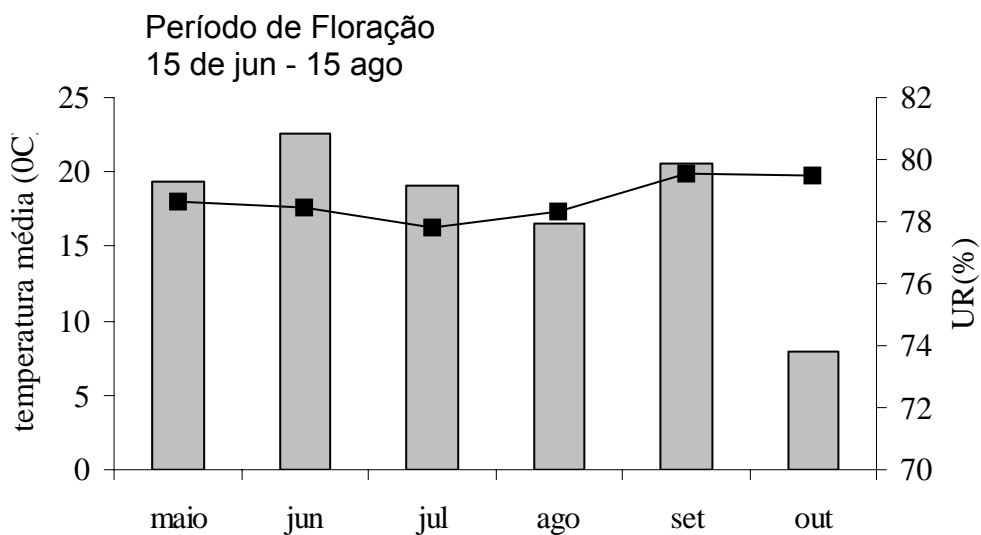
**Figura 2.** Veículo hidráulico (Munck) utilizado no processo de marcação dos botões florais e monitoramento do desenvolvimento das flores e frutos de *Tabebuia heptaphylla*. (A) Vista lateral do veículo utilizado. (B) Marcação das inflorescências na copa da árvore.

### 3. RESULTADOS

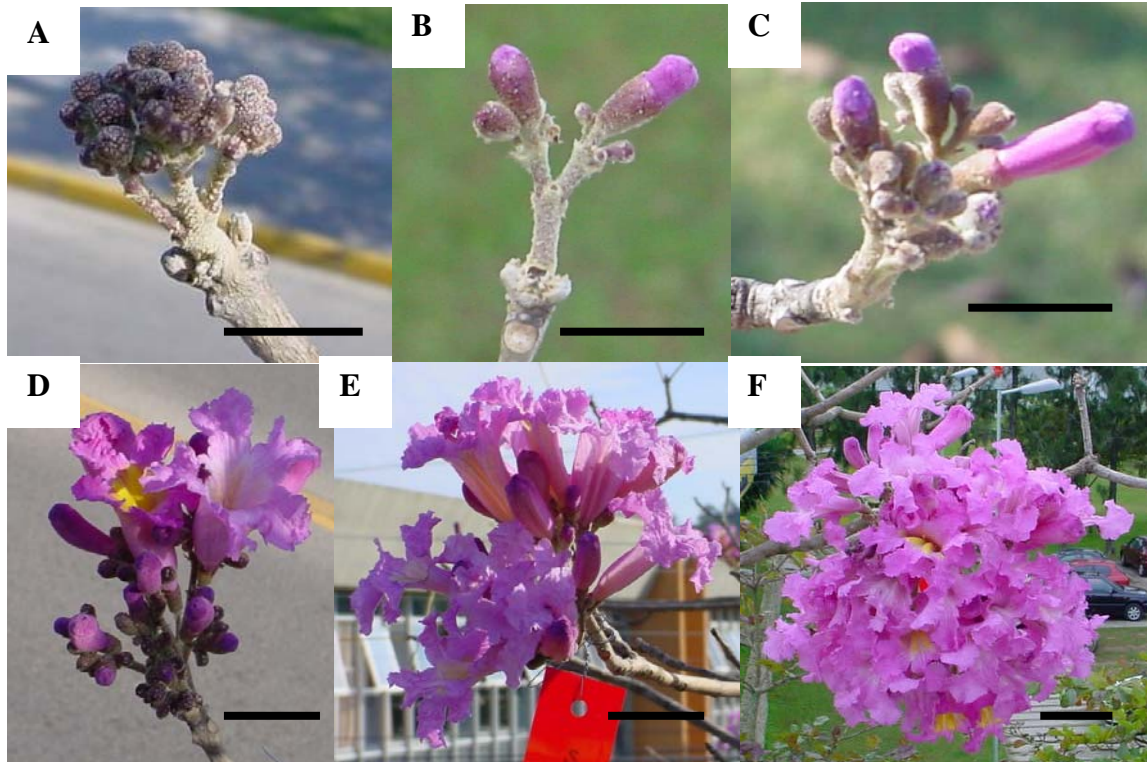
O período de floração da *Tabebuia heptaphylla* monitorada no ano de 2004 estendeu-se por aproximadamente 60 dias, de junho a agosto. A floração máxima ocorreu após 30 dias do início do evento. O início da floração ocorreu em temperaturas baixas do inverno e coincidiu com o início da queda da umidade relativa do ar (**Figura 3**). A árvore, nesse período de floração, ficou exposta a temperatura média de 16,7 °C, com mínima de 9,7 °C e máxima de 21,6 °C e UR média de 79%, mínima de 57% e máxima de 96% (**Figura 3 e anexo A**) (dados fornecidos pela Epagri/Inmet-SC, 2004).

Foi observado, baseado no aspecto visual geral, que o lado da árvore exposta a maior incidência de vento (direção sul), apresentavam menor quantidade de flores.

A abertura da flor ocorreu 9 dias após a visualização (a olho nu) dos botões florais (0,5 cm de diâmetro) e a senescência ocorreu em torno do 15<sup>o</sup> dia (**Figura 4**).



**Figura 3.** Médias mensais de temperatura (linha) e umidade relativa (barra) entre maio a outubro de 2004 (dados fornecidos pela Epagri/Inmet-SC, 2004).



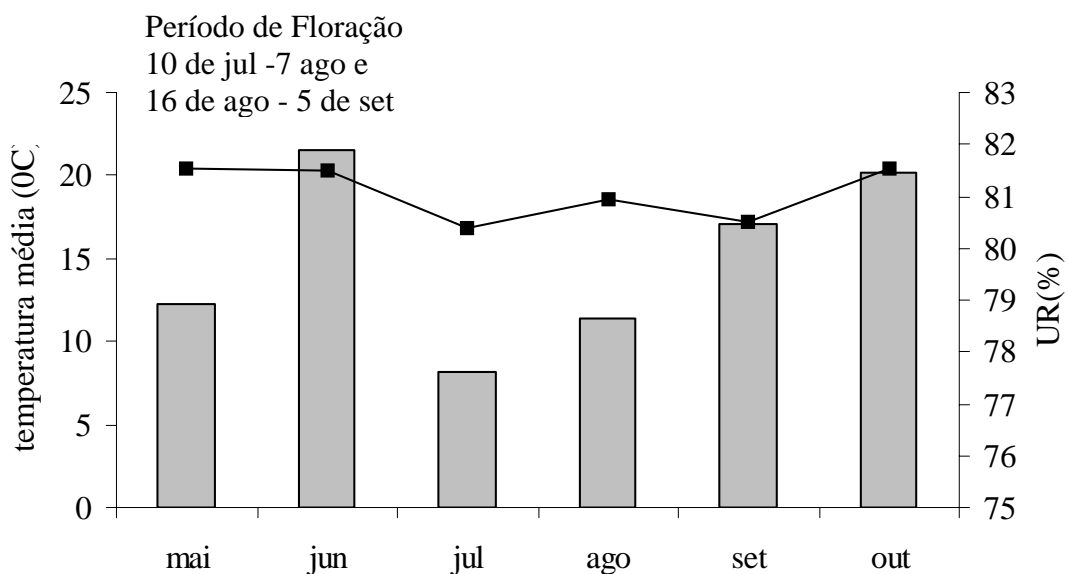
**Figura 4.** Desenvolvimento da inflorescência de *Tabebuia heptaphylla*, no período de junho a agosto de 2004, com temperatura média de  $16,7^{\circ}\text{C}$ , mínima de  $9,7^{\circ}\text{C}$  e máxima de  $21,6^{\circ}\text{C}$  e UR média de 79%, mínima de 57% e máxima de 96%. (A) Formação de botões florais. (B) Botões florais com 3 dias após o início de sua visualização. (C) Botões florais com 6 dias. (D) Início da abertura das flores, inflorescência com 9 dias. (E) Inflorescência com flores abertas e alguns botões (com 12 dias). (F) Inflorescência com máxima abertura das flores, com 15 dias e início da senescência. Barra = 3 cm.



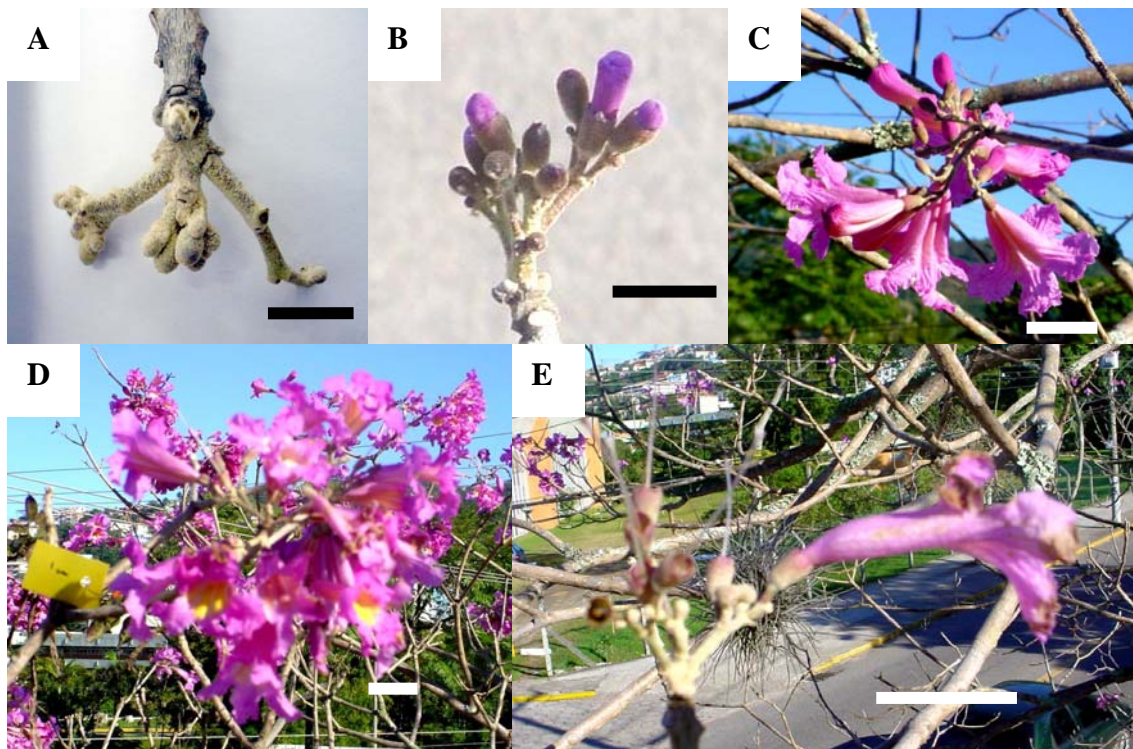
A floração da mesma árvore em 2005 iniciou em julho e não foi contínua. Inicialmente o evento teve duração de aproximadamente 30 dias, após esse período houve um breve intervalo de 10 dias, com ausência de flores e folhas, reiniciando a floração com a formação de novos botões florais. Essa segunda etapa teve duração de 20 dias. O período de floração do ano de 2005, para a árvore monitorada, totalizou 60 dias, incluindo o intervalo. Foi observado que o início da primeira floração de 2005, assim como no ano anterior, ocorreu em baixas temperaturas e após a queda da umidade relativa do ar. Verificou-se que para esse ano, a floração foi interrompida após um período de temperaturas elevadas, reiniciando com a queda de temperatura (**Figura 5**).

Em comparação com o ano de 2004, o ano de 2005, apresentou floração menos intensa, baseado no aspecto visual geral da árvore.

A abertura das flores, nesse segundo ano de monitoramento, ocorreu em torno do 6<sup>o</sup> dia, contados a partir da visualização dos botões ( $\pm 0,5$  cm) e a sua senescência ocorreu no 12<sup>o</sup> dias (**Figura 6**). No período abrangendo o início da primeira floração do ano ao fim da segunda floração a árvore ficou exposta à temperatura média de 19,39<sup>o</sup> C, mínima de 10,9<sup>o</sup> C e máxima de 26,7<sup>o</sup> C e UR média de 78,53%, mínima de 43% e máxima de 96% (**anexo A**).



**Figura 5.** Médias mensais de temperatura (linha) e umidade relativa (barra) entre maio a outubro de 2005 (dados fornecidos pela Epagri/Inmet-SC, 2005).



**Figura 6.** Desenvolvimento da inflorescência de *Tabebuia heptaphylla*, nos meses de julho e agosto de 2005. Temperatura média de 19,39 °C, mínima de 10,9 °C e máxima de 26,7 °C e UR média de 78,53%, mínima de 43% e máxima de 96%. (A) Início da visualização de botões florais. (B) Botões florais com 3 dias após o início de sua visualização. (C) Inflorescência com flores abertas e alguns botões, com 6 dias. (D) Inflorescência com máxima abertura das flores, com 9 dias. (E) Início da senescência com 12 dias. Barra das figuras 4A e 4B = 1 cm; 4C, 4D e 4E = 3 cm.

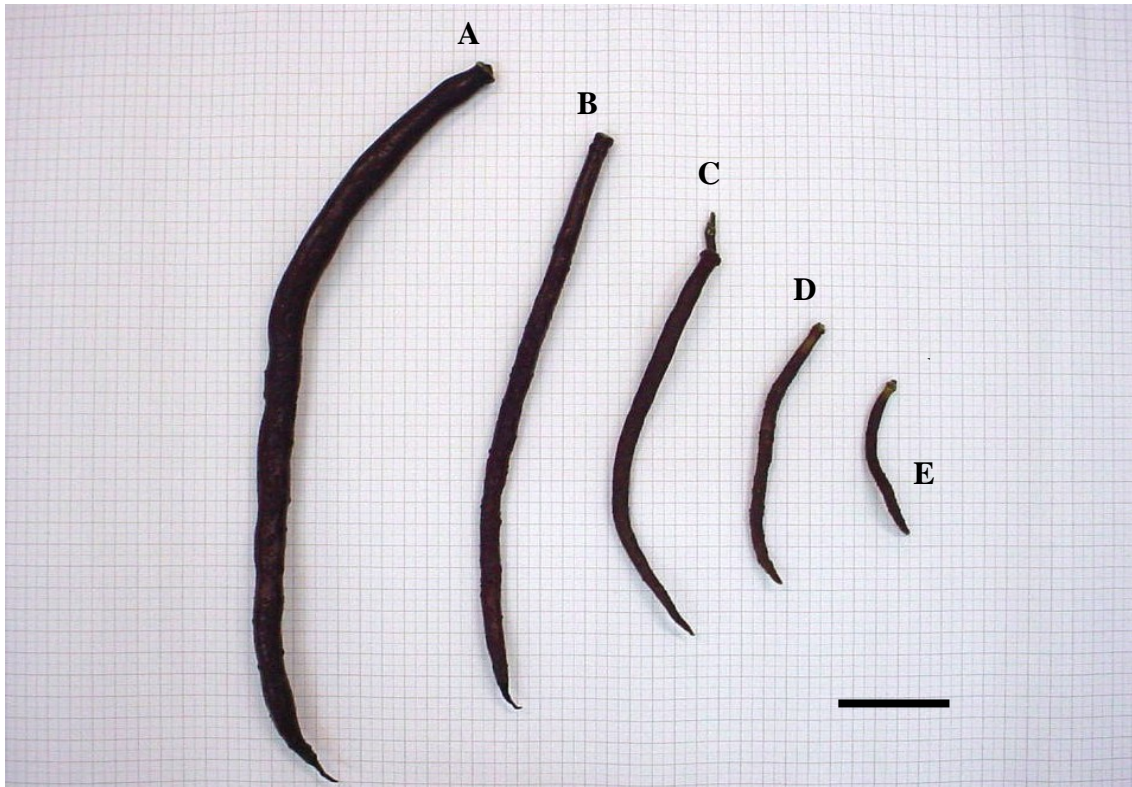
A frutificação, em 2004, iniciou após 10 dias da floração máxima e o tempo de desenvolvimento do fruto foi de aproximadamente 80 dias. Frutos com aproximadamente 45, 55, 60, 65 e 70 dias de idade (**Figura 7**), contados a partir da abertura do botão floral, apresentaram desenvolvimento conforme descrito na **Tabela 1** e **Figuras 8 e 9**. Os frutos apresentaram um incremento na massa da matéria fresca e seca em relação ao tempo e o teor de água sofreu um decréscimo, conforme aumentava a idade dos frutos (**Tabela 1 e Figura 9**).

A frutificação do ano de 2005 foi extremamente reduzida e os frutos não completaram a fase de crescimento e amadurecimento, sendo abortados antes da sua deiscência natural.

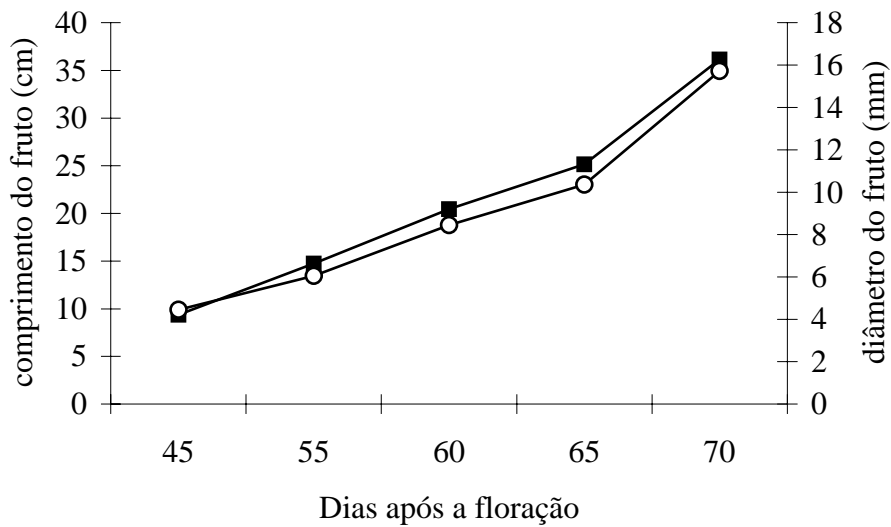
**Tabela 1.** Frutos de *Tabebuia heptaphylla* com 45, 50, 60, 65 e 70 dias após a abertura dos botões florais, coletados no município de Florianópolis/SC, nos meses de agosto e setembro de 2004, com temperatura média de 18,3<sup>o</sup>C, com mínima de 11<sup>o</sup>C e máxima de 22,5<sup>o</sup>C e UR média de 79%, mínima de 57% e máxima de 91%. Média  $\pm$  Desvio Padrão.

<b>Idade do fruto (dias)</b>	<b>Comprimento* (cm)</b>	<b>Diâmetro* (cm)</b>	<b>Massa Fresca* (g)</b>	<b>Massa Seca* (g)</b>	<b>Teor de água* (%)</b>
<b>45</b>	9,38 $\pm$ 0,63	0,45 $\pm$ 0,2	2,32 $\pm$ 0,17	0,54 $\pm$ 0,02	76,64 $\pm$ 1,30
<b>55</b>	14,73 $\pm$ 0,21	0,61 $\pm$ 0,05	5,09 $\pm$ 0,22	1,32 $\pm$ 0,04	74,03 $\pm$ 1,15
<b>60</b>	20,44 $\pm$ 0,74	0,84 $\pm$ 0,03	9,50 $\pm$ 0,31	2,44 $\pm$ 1,17	74,37 $\pm$ 1,13
<b>65</b>	25,14 $\pm$ 0,68	1,04 $\pm$ 0,04	18,05 $\pm$ 0,33	4,64 $\pm$ 0,31	74,35 $\pm$ 1,28
<b>70</b>	36,14 $\pm$ 0,73	1,06 $\pm$ 0,06	42,09 $\pm$ 0,85	10,32 $\pm$ 0,07	75,48 $\pm$ 0,35

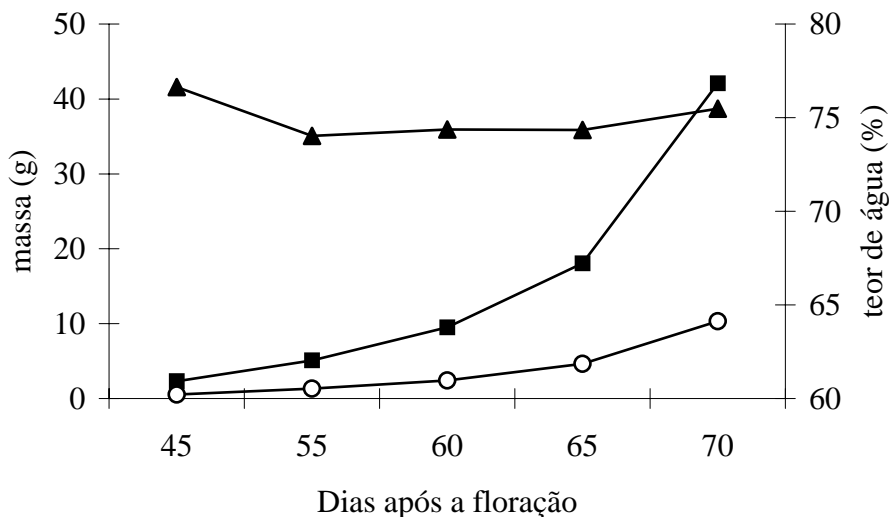
\*Média de 10 frutos para cada idade



**Figura 7.** Frutos imaturos de *Tabebuia heptaphylla* com 70 dias (A), 65 dias (B), 60 dias (C), 55 dias (D) e 45 dias (E) após a abertura do botão floral. Barra = 5 cm.



**Figura 8.** Comprimento (—○—) e diâmetro (—■—) dos frutos de *Tabebuia heptaphylla* com 45, 55, 60, 65 e 70 dias após a abertura dos botões florais, coletadas no município de Florianópolis-SC, nos meses de agosto e setembro de 2004, com temperatura média de 18,3°C, com mínima de 11°C e máxima de 22,5°C e UR média de 79%, mínima de 57% e máxima de 91%.



**Figura 9.** Massa fresca (—■—) e seca (—○—) e teor de água (—▲—) de frutos de *Tabebuia heptaphylla* em diferentes estágios de desenvolvimento, coletadas no município de Florianópolis/SC, nos meses de agosto e setembro de 2004, com temperatura média de 18,3°C, com mínima de 11°C e máxima de 22,5°C e UR média de 79%, mínima de 57% e máxima de 91%.

#### 4. DISCUSSÃO

A fase de floração da árvore de *Tabebuia heptaphylla* observada, ocorreu nos meses de junho a setembro, estando de acordo com as observações feitas por Carvalho (1994), que relata florações de janeiro a setembro. Porém, a floração foi tardia, se comparado às observações feitas para as condições ambientais do Estado de Santa Catarina, que segundo Carvalho (1994) a espécie floresce entre os meses de janeiro a julho. Esse atraso na floração pode estar relacionado às alterações climáticas do ano de 2004 e 2005 (**Figura 3 e 4**).

Em várias espécies, as variações apresentadas pela floração podem ser afetadas por fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura e umidade (Pereira-Netto, 2002). Segundo Pereira-Netto (2002) e Taiz e Zeiger (2004), a floração está relacionada às condições climáticas, em menor ou maior grau dependendo da espécie. De acordo com os autores, a indução floral ocorre, a partir da percepção dos sinais ambientais, promovendo a diferenciação dos meristemas vegetativos em meristemas de inflorescência. Alterações no clima, principalmente na temperatura e umidade, podem afetar tanto qualitativamente quanto quantitativamente a floração (Pereira-Netto, 2002; Taiz e Zeiger, 2004).

A produção de flores ocorreu em temperaturas baixas de inverno. Ao relacionar os dois anos monitorados, verificou-se que o primeiro ano apresentou temperaturas mais baixas e maior produção de flores (**Figura 3 e 5**). O que pode indicar que a temperatura afetou a floração. Outro dado, obtido pelo monitoramento, que também sugere a influência da temperatura na indução floral, foi a interrupção da produção de flores durante a fase de floração no ano de 2005. Essa paralisação do evento coincidiu com o aumento da temperatura. Além disso, as altas temperaturas, apresentadas no início do inverno de 2005, podem ter atrasado a floração, visto que o evento desse ano iniciou-se somente em julho, um mês depois do esperado, se comparado ao ano anterior.

Outros autores têm relatado o efeito da temperatura na formação de flores em diversas espécies, porém não foram encontrados registros desse fenômeno para o gênero *Tabebuia*. Molina *et al.* (2005) reportaram que a ocorrência de verão prolongado e quente, atrasa a emergência das flores de *Crocus sativus* e que as altas temperaturas reduzem a formação de flores e podem causar aborto em algumas flores em formação. Valencia-Díaz e Montaña (2005) relataram evidências

de que as variações de temperatura afetam a qualidade e o tamanho das sementes de *Flourensia cernua* DC. Para os autores, temperaturas abaixo de 0 °C podem induzir ao aborto do fruto.

A umidade relativa do ar é outro fator que pode ter influenciado a floração da árvore monitorada. De forma mais evidente que a temperatura, a queda da umidade pode ter induzido a formação de flores, já que a floração foi observada no período de menor umidade relativa do ar (**Figura 3 e 5**), estando de acordo com as observações feitas por Barros (2001). Este autor relata que a *Tabebuia aurea* e a *T. ochracea* florescem somente durante a estação seca. Esse comportamento, provavelmente está relacionado à adaptação da espécie às condições que favoreçam posteriormente, a maturação e desidratação dos frutos (Pereira-Netto, 2002; Piedade-Kill e Ranga, 2000).

A frutificação, em consequência da fase de floração, também é afetada pelas variações climáticas. Segundo Pereira-Netto (2002), além da qualidade fisiológica dos órgãos reprodutivos, formados durante a floração, o desenvolvimento normal do fruto está relacionado à polinização e fertilização. Sendo esses fatores, segundo o autor, dependentes da viabilidade do pólen e da eficiência dos polinizadores e dispersores. A ausência da fertilização completa, geralmente ocasiona o aborto da estrutura reprodutiva.

Sendo assim, a baixa frutificação ocorrida no ano de 2005, e a ausência de frutos maduros, com sementes viáveis, podem ter sido induzidas pelas alterações climáticas. De acordo com o exposto acima, essas alterações no clima, pode tanto ter reduzido a quantidade e a qualidade fisiológica dos órgãos reprodutivos, como ter reduzido a eficiência da polinização.

Dag *et al.* (2000), reportaram que variações na temperatura, podem causar a degeneração e a baixa viabilidade do pólen de *Mangifera indica*, reduzindo a sua capacidade de germinação. E de acordo com Abe e Kamo (2003), as condições ambientais interferem na eficiência da polinização, interferindo diretamente nas espécies polinizadoras. Como o gênero *Tabebuia* é preferencialmente polinizado por abelhas, moscas e pássaros e esses polinizadores são suscetíveis às variações climáticas, alterações no clima podem ter acarretado problemas na polinização, e conseqüentemente na produção de frutos. (Barros, 2001; Abe e Kamo, 2003; Souza *et al.*, 2004).

O desenvolvimento dos frutos em 2004, foi semelhante ao relatada por Gemaque *et al.* (2002) para *Tabebuia impetiginosa*. A desidratação do fruto de *Tabebuia heptaphylla* iniciou-se após 45 dias da abertura do botão floral (**Figura 9**) e sua deiscência foi observada aos 80 dias. Para a *T. impetiginosa* foi relatado o início do processo de perda de água aos 60 dias e a deiscência aos 120 dias (Gemaque *et al.*, 2002).

O tamanho dos frutos maduros, próximos à deiscência foi de  $36,14 \pm 0,73$  cm de comprimento e  $1,06 \pm 0,06$  cm de diâmetro (**Tabela 1**). Esses valores correspondem ao relatados por Carvalho (1994), que descreve frutos com comprimento de 20-35 cm e diâmetro de 1,5 cm para a espécie. Essas observações indicam que o ano de 2004, ao contrário de 2005, ofereceu condições ambientais adequadas para o floração e frutificação da *T. heptaphylla* observada.

## 5. CONCLUSÕES

De forma geral, os dados obtidos, indicaram que as variações, na floração e frutificação da *Tabebuia heptaphylla*, podem estar relacionadas às alterações de temperatura e umidade. Um monitoramento fenológico mais amplo permitirá estabelecer com maior precisão quais os fatores ambientais que afetam esse evento e assim compreender o processo reprodutivo da espécie, possibilitando o desenvolvimento de estratégias para a sua conservação e propagação.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; KAMO, K. Seasonal changes of floral frequency and composition of flower in two cool temperate secondary forest in Japan. **Forest Ecology and Management** 175:153-162, 2003.

BARROS, M. G. Pollination ecology of *Tabebuia áurea* (Manso) Benth. & Hook. And *T. ochraceae* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae) in Central Brazil cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24. p. 255-261,2001.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília: Embrapa-SPI, 639p. 1994.

COSTA, M. E.; SAMPAIO, D. S.; PAOLI, A. A. S. LEITE, S. C. A. L. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochraceae* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 395-406, 2004.

DAG, A.; EISENSTEIN, D.; GAXIT, S. Effect of temperature regime on pollen and the effective pollination of 'Kent' mango in Israel. **Scientia Horticulturae**. 86:1-11, 2000.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. Universidade/UFRGS/ UFSC, Porto Alegre/Florianópolis. p. 545-568, 1999.

GEMAQUE, R. C.R.; DAVIDE, A. C.;FARIA, J. M. R. Indicadores de Maturidade Fisiológica de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) **Cerne**, v. 8, p. 84-91. 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 4. ed. Editora Nacional, São Paulo, 1997.

MOLINA, R. V.; VALERO, M.; NAVARRO, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). **Scientia Horticulturae**. 103:361-379, 2005.

PEREIRA-NETTO, A. B. Crescimento e desenvolvimento. In: WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. (org.) **Fisiologia Vegetal: produção e pós-colheita**. p. 17-41, 2002.

PIEDADE-KILL, L. H.; RANGA, N. T. Biologia floral e sistema de reprodução de *Jacquemontia multiflora* (Choisy) Hallier f. (Convolvulaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 23, p. 37-43, 2000.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. EPU, Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1976.

SCHULTZ A. R. H. **Introdução à botânica sistemática**. 4.ed. rev. Editora da Universidade, UFRGS, Porto Alegre, 1984.

SOUZA, D., A.; LENZI, M.; ORTH, A. I. Contribuição à ecologia da polinização de *Tabebuia pulcherrima* (Bignoniaceae) em área de restinga, no sul de Santa Catarina. **Biotemas**, v. 17, p. 47-66, 2004.

SOUZA, L., A; IWAZAKI, M., C.; MOSCHETA, I., S. Morphology of the Pericarp and Seed of *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.3. p. 407-418, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VALENCIA-DÍAZ, S.; MONTAÑA, C. Temporal variability in the maternal environment and its effect on seed size and seed quality in *Flourensia cernua* DC. (Asteraceae). **Journal of Arid Environments**. n. 63, p. 686-695, 2005.

VIANA, A. M.; MAZZA, M. C.; MANTELL, S. 1999. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain forests. In: BENSON, E. E. **Plant Conservation Biotechnology**. Taylor & Francis, London, cap. 18, p.277-299, 1999.

## **GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Tabebuia heptaphylla* (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)**

### **1. INTRODUÇÃO**

A *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae) possui produção anual de sementes, sendo essa, a principal forma de propagação atualmente empregada para o gênero (Gemaque, 2002).

Segundo Carvalho (1994), as sementes de *T. heptaphylla* apresentam baixo potencial de armazenamento, perdendo seu poder germinativo aos 60 dias em condições naturais, Este autor observa que as sementes podem conservar sua viabilidade por até 15 meses, se armazenadas em câmara fria/seca (com temperatura de 12<sup>o</sup>C e umidade relativa de 50%). Com o aumento da umidade ou da temperatura, a viabilidade das sementes reduz drasticamente para 7 meses, com umidade relativa de 90% e para 5 meses, com temperatura de 28<sup>o</sup> C (Carvalho, 1994). A germinação da *T. heptaphylla* inicia-se entre 7 a 30 dias após a sementeira, com uma média germinativa em torno de 60% (Carvalho, 1994).

Carvalho (1994) e Lorenzi (1998), indicam que a coleta dos frutos deve ser realizada antes da dispersão das sementes, imediatamente, quando os primeiros frutos iniciarem a abertura espontânea.

Segundo Gemaque (2002), o conhecimento do ponto de colheita é fundamental para a obtenção de sementes de alta qualidade fisiológica. O processo de desenvolvimento das sementes compreende uma série de estágios ontogênicos, desde a fertilização, acumulação de nutrientes, perda de água até a dormência. Cada um desses estágios representa mudanças morfológicas e fisiológicas que podem alterar o futuro desempenho das sementes (Delouche, 1974). A época ideal para a coleta é quando as sementes adquirem o máximo de matéria seca, no qual as sementes estão no chamado ponto de maturação fisiológica e alcançam o máximo de vigor e germinação (Delouche, 1974).

O estudo de maturação do fruto e das sementes, caracterizando as fases de desenvolvimento através de parâmetros como mudança de coloração, tamanho,

massa fresca e seca e teor de água, possibilita prever e estabelecer a época adequada de coleta (Gemaque, 2002).

Não foram encontrados registros bibliográficos relatando indicadores de maturidade fisiológica de sementes de *T. heptaphylla*, contudo Gemaque (2002) reporta que a antecipação da coleta de sementes de *T. impetiginosa* pode resultar em baixa porcentagem de germinação. Por outro lado, o autor ressalta que o retardamento da coleta pode prejudicar sua qualidade fisiológica. Além disso, a coleta deve ser realizada antes da abertura dos frutos para evitar a dispersão das sementes pelo vento.

Vários trabalhos têm relatado o uso de BAP para induzir a germinação de sementes que não se encontram no ponto de maturação fisiológica (Côme, 1981; Dantas *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2004). Segundo Côme (1981) e Taiz e Zeiger (2004) a germinação das sementes é controlada pelo balanço de inibidores e promotores de crescimento, onde auxinas, giberilinas e citocininas podem servir como promotores, e o ácido abscísico (ABA) provavelmente é o inibidor mais significativo da germinação. Dantas *et al.* (2001) e Nogueira *et al.* (2004) relatam ainda, que a citocinina atua na quebra do efeito do ácido abscísico, inibidor do processo germinativo. Portanto, segundo esses autores o uso do BAP pode induzir a germinação de sementes fisiologicamente imaturas, com altas concentrações de ABA.

Assim, esse trabalho foi conduzido, com o objetivo de estabelecer a época ideal de coleta das sementes, verificar o potencial germinativo de sementes fisiologicamente imaturas e testar o efeito do BAP na germinação dessas sementes. Este trabalho analisou também o processo de desinfestação, estabelecimento e crescimento *in vitro* de *T. heptaphylla*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Preparação dos meios de culturas e reguladores de crescimento

Todos os meios de cultura utilizados nos experimentos deste trabalho foram suplementados com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel e em alguns experimentos, com BAP em diferentes concentrações. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem que ocorreu por 18 minutos a 120<sup>o</sup>C. O regulador de crescimento foi dissolvido em NaOH 0,1M e solubilizado em água destilada.

### 2.2. Condições de cultura

As culturas foram mantidas em sala de crescimento do Laboratório de Fisiologia Vegetal do CCB/UFSC, à temperatura controlada de 25 ± 2<sup>o</sup>C, dispendo de lâmpadas fluorescentes Philips TDL (22µmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>), com fotoperíodo de 16 horas.

### 2.3. Desinfestação e introdução de sementes imaturas *in vitro*

A germinação de sementes imaturas foi observada, utilizando-se frutos imaturos de *Tabebuia heptaphylla* em diferentes estágios de desenvolvimento, com 55, 60, 65 e 70 dias após a abertura do botão floral.

Os frutos foram lavados abundantemente com detergente neutro e água corrente e submetidos ao processo de desinfecção, com imersão em etanol 70 <sup>o</sup>GL por 5 minutos e posterior imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo, durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar.

Após o processo de desinfestação, as sementes foram removidas e introduzidas em placas de Petri esterilizadas e descartáveis (90 x 15 mm), contendo 25 ml de meio de cultura WPM, suplementados com BAP nas concentrações de 0; 2; 4; 8 e 16 µM. Cada placa de Petri continha 5 sementes. As culturas foram mantidas no escuro.

Foram utilizados 5 repetições com 20 sementes para cada tratamento e a avaliação consistiu na determinação da porcentagem máxima de germinação. Os dados obtidos foram previamente transformados em arc sen √% e submetidos à Análise de Variância (ANOVA), com separação de médias pelo teste de Duncan (p < 0,05) (Gomez e Gomez, 1984).

#### 2.4. Desinfestação e introdução de sementes maduras *in vitro*

A germinação de sementes maduras foi avaliada, utilizando-se sementes de *Tabebuia heptaphylla* fornecidas pelo Instituto Florestal de São Paulo, coletadas na Floresta Estadual de Avaré, município de Avaré/SP (**Figura 10**). As sementes, após serem lavadas com detergente e água corrente, foram desinfestadas, em câmara de fluxo laminar, em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo durante 15 e 30 minutos. Após esses períodos, as sementes foram lavadas 3 vezes com água destilada esterilizada e introduzidas em tubos de ensaio (20 x 150 mm), contendo 8 ml de meio de cultura MS.

A germinação foi monitorada diariamente. Foram utilizadas 3 repetições com 10 sementes cada. Os dados obtidos foram previamente transformados em  $\arcsin \sqrt{\%}$  e submetidos ao teste t de Student ao nível de 5% (Centeno, 1981). Para cada tratamento foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG).



**Figura 10.** Sementes maduras de *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae). Barra = 1,0 cm.

#### 2.5. Comparação entre a germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes maduras

Após o estabelecimento do protocolo de desinfestação, um novo experimento foi conduzido, visando determinar a curva de germinação *in vitro*. As sementes foram submetidas ao processo de desinfestação descrito no item 2.4. com imersão em hipoclorito de sódio por 30 minutos e introduzidas em tubos de ensaios (20 x 150 mm), contendo 8ml de meio MS. Simultaneamente à introdução das sementes *T. heptaphylla in vitro*, foram postas para germinar sementes do mesmo lote, em placas de Petri, sobre papéis filtro embebidos em água destilada. A germinação *in vitro* e *ex*

*in vitro* foi monitorada diariamente até a estabilização das mesmas e os resultados comparados entre si.

Foram utilizadas 5 repetições, com 28 sementes cada. Os dados obtidos foram previamente transformados em  $\arcsin \sqrt{\%}$  e submetidos ao teste t de Student ao nível de 5% (Centeno, 1981). Para cada tratamento foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

## **2.6. Determinação do Índice de Velocidade de Germinação**

Para cada repetição dos experimentos de germinação de sementes maduras foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG), empregando a fórmula de Maguire (1996 *apud* Nakagawa, 1999):  $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$ .

Onde :  $G_1, G_2, G_n$  = número de plântulas que emitiram radícula, computadas na primeira contagem, na segunda e na última contagem.

$N_1, N_2, N_n$  = número de dias da inoculação da semente ou embrião no meio de cultura à primeira contagem, à segunda e à última contagem.

## **2.7. Desenvolvimento de plantas *in vitro***

As plantas, obtidas da germinação *in vitro* de sementes maduras, foram avaliadas com 15, 30 e 70 dias após a emissão da radícula quanto às massas fresca e seca, ao comprimento do caule, ao número de folhas e ao número de nós. Foram utilizadas 15 plantas para cada idade. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), com separação de médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Gomez e Gomez, 1984).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Desinfestação e introdução de sementes imaturas *in vitro*

Os resultados de germinação *in vitro* de sementes imaturas de *Tabebuia heptaphylla* demonstraram que o estágio de maturação do fruto é um fator significativo na germinação. Embriões oriundos de frutos mais desenvolvidos apresentaram uma maior porcentagem de germinação.

Os resultados da germinação revelaram que há uma interação significativa entre o estágio de desenvolvimento do fruto e a concentração de BAP (**Tabela 2 e Apêndice A**). Sementes oriundas de frutos com 70 dias apresentaram maior porcentagem de germinação em meio de cultura com a adição de 4  $\mu\text{M}$  de BAP (34%), já sementes de frutos com 55, 60 e 65 dias, apresentaram a maior porcentagem de germinação em meio suplementado com 8  $\mu\text{M}$  de BAP (8, 11 e 20% respectivamente) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Germinação máxima *in vitro* de embriões imaturos oriundos de frutos com 70, 65, 60 e 55 dias após a floração (contados a partir da visualização dos botões florais), em meio WPM suplementado com BAP nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$

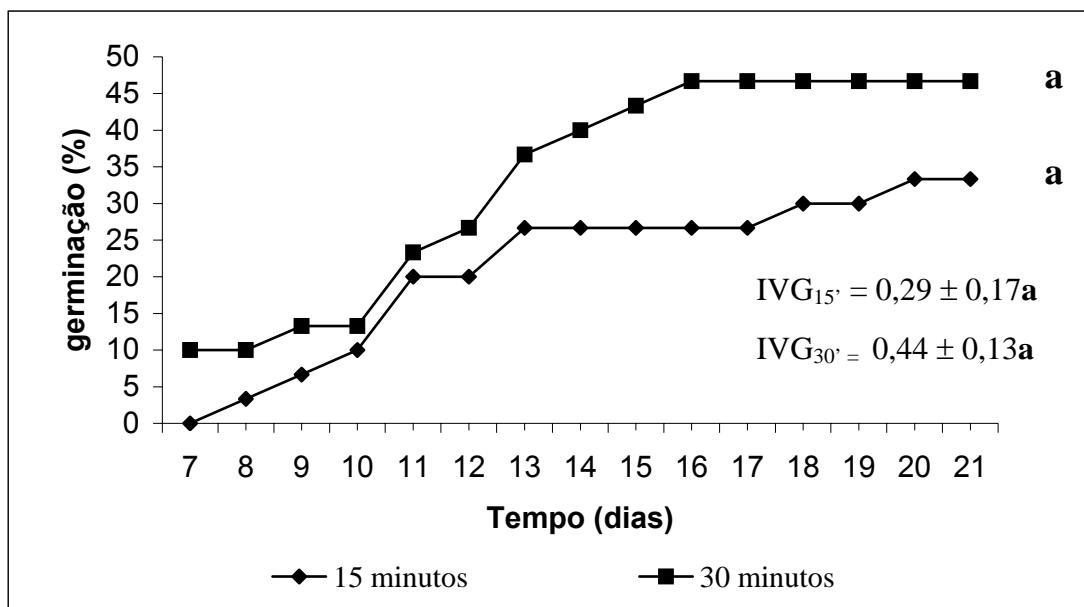
Idade do fruto (dias)	Concentração de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Germinação*
70	0	6 bc
	2	11 c
	4	34 e
	8	18 d
	16	6 bc
65	0	1 a
	2	6 bc
	4	10 c
	8	20 d
	16	6 bc
60	0	0 a
	2	1 a
	4	4 b
	8	11 c
	16	4 b
55	0	0 a
	2	0 a
	4	2 a
	8	8 c
	16	1 a

\* Média de 5 repetições com 20 sementes cada. Valores seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Duncan.

### 3.2. Desinfestação e introdução de sementes maduras *in vitro*

Não houve contaminação nas sementes que sofreram o processo de desinfestação com imersão em hipoclorito de sódio. Para as sementes tratadas com hipoclorito de sódio por 15 minutos houve uma porcentagem de germinação de  $33,33 \pm 15,28\%$ , já as sementes tratadas com hipoclorito de sódio por 30 minutos apresentaram porcentagem de germinação de  $46,7 \pm 5,77\%$ . A germinação das sementes imersas em hipoclorito de sódio por 15 minutos iniciou-se no 7<sup>o</sup> dia e estabilizou-se no 13<sup>o</sup> dia. Já as sementes imersas em hipoclorito por 30 minutos iniciaram a germinação no 8<sup>o</sup> dia e estabilizaram no 15<sup>o</sup> dia (**Figura 11**).

A porcentagem de germinação e a velocidade de germinação (IVG) de sementes que sofreram o processo de desinfestação com imersão em hipoclorito de sódio por 15 minutos não apresentaram diferenças significativas em relação às imersas por 30 minutos, sendo que o IVG do primeiro caso (15 minutos em hipoclorito de sódio) foi de  $0,29 \pm 0,17$  e do segundo caso de  $0,44 \pm 0,13$  (**Figura 11**).

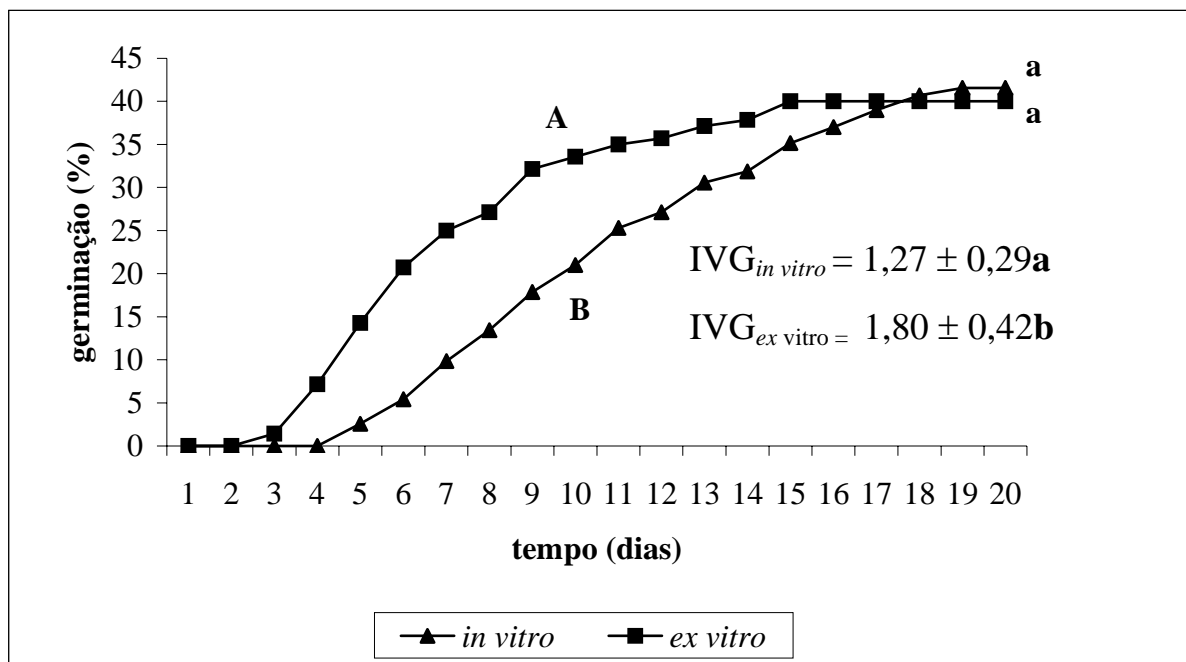


**Figura 11.** Germinação *in vitro* de sementes de *Tabebuia heptaphylla* em meio MS/2, submetidas ao processo de desinfestação com imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 e 30 minutos. Média de 3 repetições com 10 sementes. Valores seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente entre si pelo teste t de student ao nível de 5%.

### 3.3. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Tabebuia heptaphylla*

A germinação *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla*, avaliada a partir da emissão da radícula, teve início a partir do 5<sup>o</sup> dia após a introdução da semente *in vitro* e estabilizou-se após o 19<sup>o</sup> dia, apresentando uma porcentagem de  $43,56 \pm 11,04\%$ . A germinação *ex vitro* iniciou e estabilizou primeiro que a *in vitro*, sendo estatisticamente superior que a germinação *in vitro* até o 10<sup>o</sup> dia. Porém a germinação final não apresentou diferenças estatísticas ( $40 \pm 6,87\%$ ), iniciando a partir do 3<sup>o</sup> dia e estabilizando no 15<sup>o</sup> dia.

O índice de velocidade de germinação de sementes *ex vitro* ( $1,27 \pm 0,29$ ) foi superior ao IVG das sementes *in vitro* ( $1,80 \pm 0,42$ ) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Germinação *in vitro* de sementes de *Tabebuia heptaphylla* em meio MS, submetidas ao processo de desinfecção em hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos e germinação *ex vitro* de sementes sob papel filtro embebido em água destilada. Média de 5 repetições com 28 sementes. Valores seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste t de student.

### 3.4. Desenvolvimento de plantas *in vitro*

Para os parâmetros avaliados, as plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla*, originadas da germinação *in vitro*, apresentaram o desenvolvimento descrito na **Tabela 3** e **Figura 13**. Foram observadas diferenças estatísticas entre as plantas com diferentes idades, para a massa fresca e para o número de folhas e nós. A massa seca das plantas, com 15 dias de idade, foi significativamente inferior as plantas com 30 e 70 dias, sendo que essas últimas apresentaram massa seca semelhante estatisticamente.

Plantas com 15 e 30 dias de idade não apresentaram diferenças significativas no comprimento do caule, porém ambas diferiram estatisticamente das plantas com 70 dias de idade (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Desenvolvimento de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 15, 30 e 70 dias de idade.

Idade (dias)	Massa Fresca (mg)*	Massa Seca (mg)*	Comprimento do Caule (mm)*	Número de folhas*	Número de Nós*
15	336,33 A	44,40 A	37,87 A	2,00 A	2,00 A
30	514,93 B	63,13 B	41,40 A	4,13 B	3,07 B
70	724,87 C	69,20 B	51,13 B	5,93 C	4,27 C

\* Média de 15 plantas para cada idade. Valores da mesma coluna, seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.



**Figura 13.** Plantas de *Tabebuia heptaphylla*, oriundas de sementes maduras, crescidas *in vitro*. (A) Planta com 15 dias após a emissão da radícula. (B) Planta com 30 dias após a emissão da radícula. (C) Planta com 70 dias após a emissão da radícula. Barra = 2 cm.

#### 4. DISCUSSÃO

As sementes oriundas de frutos de *Tabebuia heptaphylla* em estágio de desenvolvimento mais avançado, próximo a sua deiscência, apresentaram porcentagem de germinação superiores em relação às sementes em estágio precoce de desenvolvimento (**Tabela 2**). Segundo Gemaque (2002), a antecipação da coleta, pode resultar em baixa porcentagem de germinação.

A baixa taxa de germinação apresentada pelas sementes de frutos mais jovens pode indicar que as coletas foram realizadas quando as sementes já tinham iniciado o processo de dormência temporária. A ocorrência desse evento no gênero *Tabebuia*, foi relatada por Germaque *et al.* (2002) para sementes de *Tabebuia impetiginosa* e por Carvalho (2000) para sementes de *T. serratifolia*.

Na tentativa de aumentar a porcentagem de germinação para sementes imaturas, foram conduzidos experimentos com a adição de BAP no meio de cultura. Os resultados obtidos nos experimentos demonstraram que a adição de BAP favoreceu a germinação (**Tabela 2**), provavelmente porque a citocinina atua na quebra do efeito do ácido abscísico (ABA), que inibe o processo germinativo (Dantas *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2004). Dantas *et al.* (2001), demonstraram que o uso de BAP é eficiente na superação da dormência de *Malus spp.*, exercendo um efeito positivo na germinação.

O estágio de desenvolvimento dos frutos restringiu o efeito do BAP na germinação. Sementes mais jovens apresentaram as menores porcentagens de germinação, além disso, houve uma interação significativa entre o estágio de desenvolvimento e a concentração de BAP (**Tabela 2 e Apêndice A**). A máxima germinação de sementes mais jovens necessitou de maior concentração da citocinina; provavelmente essas sementes, já se encontravam na fase intermediária da embriogênese. Isso porque geralmente o ABA apresenta-se em baixas concentrações no início da embriogênese, aumentando durante o processo, com níveis elevados na fase intermediária, quando então reduz a sua concentração gradativamente até a maturidade da semente (Taiz & Zeiger, 2004).

A germinação *in vitro*, de sementes de *T. heptaphylla*, na ausência de contaminação das culturas, demonstrou que a metodologia de desinfestação das sementes, com imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, foi eficiente e não afetou a sua viabilidade.

A utilização de sementes como explante inicial nas culturas *in vitro*, tem sido relatada para muitas espécies, principalmente, para plantas lenhosas, que apresenta dificuldades na desinfecção de outros tipos de explantes (Nunes, 2000).

Diversos protocolos indicam a utilização de hipoclorito de sódio como agente desinfetante. Couto *et al.* (2004), relataram que para sementes de *Swietenia macrophylla* o melhor tratamento de desinfecção foi a imersão em hipoclorito a 2,5 e 5 % por 30 e 20 minutos respectivamente.

Nunes (2000) afirma que o processo de desinfestação deve ser ajustado para cada caso, porém os resultados apresentados pela *Tabebuia heptaphylla* não mostraram diferenças entre a imersão em hipoclorito por 15 e 30 minutos. Em ambos os casos, houve a assepsia total e porcentagens de germinação semelhantes.

As condições *in vitro* não afetaram a porcentagem máxima de germinação da *T. heptaphylla*, que apresentou valores semelhantes estatisticamente aos obtidos na germinação *ex vitro*, indicando que o meio de cultura não inibiu a germinação (**Figura 12**).

Apesar da germinação *in vitro* e *ex vitro* não apresentarem diferenças significativas nas porcentagens máximas de germinação, a primeira ocorreu de forma mais lenta que a segunda (**Figura 12**). Provavelmente a concentração osmótica do meio de cultura associada às condições *in vitro* não favoreceu a liberação de água, afetando na velocidade de germinação. Segundo Castro e Hilhorst (2004), a atividade respiratória e ativação do metabolismo da semente inicia-se com um incremento de água de aproximadamente 20%. Assim a taxa inicial de embebição pode alterar acentuadamente a velocidade de germinação.

De acordo com os resultados (**Tabela 3** e **Figura 13**), as plantas *in vitro* apresentaram crescimento contínuo até os 70 dias de idade, sem nenhum sintoma visual de anormalidade e com incremento regular na massa fresca, sugerindo que o processo de desinfestação e o meio de cultura foram adequados. Porém, a massa seca estabilizou-se em plantas com 30 dias de idade, apesar da massa fresca ter aumentado em plantas com 70 dias, o que pode indicar o início do processo de vitrificação nessa idade.

As plantas com 30 dias de idade, já apresentavam desenvolvimento adequado, com média de 3,07 nós, para serem utilizadas como fonte de diferentes explantes (**Tabela 3**). Contudo, nesse trabalho optou-se por utilizar as plantas com

70 dias de idade, devido ao seu maior comprimento (média de 5,11 cm) e espaçamento entre os nós, facilitando a manipulação e a excisão de segmentos caulinares nodais.

## **5. CONCLUSÕES**

O estágio de maturação dos frutos de *Tabebuia heptaphylla* influencia na germinação. Assim a antecipação da coleta de sementes pode reduzir o seu potencial germinativo.

O uso de BAP pode ser considerado uma alternativa para induzir a germinação de sementes fisiologicamente imaturas de *T. heptaphylla*, já que mostrou ter um efeito positivo na germinação dessas sementes. Contudo, concentração de BAP a ser utilizado deve ser inversamente proporcional ao estágio de desenvolvimento das sementes.

A cultura de *T. heptaphylla in vitro* pode ser estabelecida em meio MS ou WPM semi-sólido, utilizando-se de sementes como explante inicial e originando plantas visualmente normais.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, P. E. R. **Especies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília, D.F.: Embrapa-SPI, 639p., 1994.

CARVALHO, L. R. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento**. 97p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia Florestal – Universidade Federal de Lavras, MG), 2000.

CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e Reativação do Metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 149-162., 2004.

CENTENO, A. J. **Curso de estatística aplicada à Biologia**. Goiânia: ed. UFG, 188p., 1981.

CÔME, D. Problems of embryonal dormancy as exemplified by apple embryo. **Israel Journal of Botany**. Jerusalem, v. 29, p. 145-156, 1981.

COUTO, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfecção e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Arvore**, v. 28, n.5, p. 633-642, 2004.

DELOUCHE, J. C. Maintaining soybean seed quality. In: **Soybean: Production, marketing, and use**. Muscl Schoals: NFDC, TVA, Bull. Y. 69:46-62, 1974.

DANTAS, A. C. M.; NUNES, J. C. O.; MORAES, L. K.A.; PEDROTTI, E. L.; NODARI, R. O. Resgate de embriões imaturos *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus spp.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 23, n. 2, p. 246-249, 2001.

GEMAQUE, R. C.R.; DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R. Indicadores de Maturidade Fisiológica de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) **Cerne**, v. 8, n. 2, p. 84-91, 2002.

GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. **Statistical Procedures for Agricultural Research**. Singapore: John Wiley & Sons, 660p., 1984.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2ed. São Paulo: Plantarum, v. 1, 352p. 1998.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R., CASTRO, A. H; VIERA, C. V. ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação in vitro de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 28, n.5, p. 1053-1059, 2004.

NUNES, E. C. **Sistemas de cultura e conservação in vitro para *Cedrella fissilis* Vell. (Meliaceae)**. 106p. (Dissertação – Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina). 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

## **CALOGÊNESE A PARTIR DE SEMENTES ZIGÓTICAS IMATURAS DE *Tabebuia heptaphylla* (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)**

### **1. INTRODUÇÃO**

A cultura de tecidos, termo utilizado para designar a cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas, além representar um potencial para o melhoramento genético e propagação da espécie, oferece alternativas para produção de metabólitos secundários de interesses econômicos e medicinais (George, 1993; Kerbauy, 1998). Sendo ainda, a cultura de calos e suspensões celulares de relevante importância nas investigações de diferenciação celular e de biologia molecular (Veasey *et al.*, 1991).

A formação de calos *in vitro*, pode ser iniciada a partir de um explante excisado de uma planta doadora, e inoculado em meio de cultura, em condições estéreis; induzida pelos estímulos de reguladores de crescimento endógenos ou exógenos (George, 1993).

Segundo George (1993) e Hu e Ferreira (1998), explantes de tecidos jovens continuam a divisão celular e, geralmente, formam calos em cultura *in vitro*, mais facilmente que os explantes mais velhos. Assim, as sementes, contendo embriões zigóticos, são consideradas por esses autores, excelente fontes de explantes para iniciar a cultura de calos.

Segundo Stafford e Warren (1991) e Kerbauy (1998), o estabelecimento da cultura de calos passa por três etapas: a indução, quando ocorre a ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular; a divisão, onde as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor; e a diferenciação, em que as células se tornam maiores, vacuolizadas, a taxa de divisão diminui e ocorre o equilíbrio entre a divisão e expansão celular.

Geralmente, as auxinas são utilizadas para induzir a formação de calos, já que estimulam a divisão celular e promovem o crescimento das células (George, 1993; Taiz e Zeiger, 2004). A auxina requerida com maior frequência para a indução de calos é o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoacético). Porém as culturas expostas ao 2,4-D estão susceptíveis (em maior probabilidade) a variações genéticas, assim

alguns pesquisadores preferem o uso de ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) ou AIA (ácido indol-3-acético) (George, 1993).

Gomes *et al.* (2004) demonstraram a formação de calos a partir de tecidos oriundos de embriões zigóticos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) em diferentes concentrações de 2,4-D. Kim *et al.* (2004) iniciaram a cultura de calos de *Catharanthus roseus* a partir de embriões zigóticos imaturos expostos a 4,52  $\mu$ M de 2,4-D.

A *Tabebuia heptaphylla* apresenta metabólitos secundários de importância econômica e medicinal como as naftoquinonas, cujas atividades farmacológicas tem sido estudadas com grande interesse (Rizzini, 1976; Teske e Trentini, 1997; Falkenberg, 1999). Assim, estudos abordando a cultura *in vitro* dessa espécie, podem ser importantes para sua propagação e produção de metabólitos secundários na área industrial.

Este trabalho teve como objetivo, estudar o potencial de sementes imaturas de *T. heptaphylla* para a formação de calos, quando expostas a diferentes concentrações de 2,4D e Picloram.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Preparação dos meios de culturas e reguladores de crescimento

Todos os meios de cultura utilizados nos experimentos deste trabalho foram suplementados com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel e em alguns experimentos, com reguladores de crescimento em diferentes concentrações. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem que ocorreu por 18 minutos a 120<sup>0</sup>C. Os reguladores de crescimento foram dissolvidos em NaOH 0,1M e solubilizados em água destilada.

### 2.2. Condições de cultura

As culturas foram mantidas em sala de crescimento do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do CCA/UFSC, à temperatura controlada de 25 ± 2<sup>0</sup>C, no escuro ou expostas ao fotoperíodo de 16 horas, através de lâmpadas fluorescentes Sylvânia que forneciam 40 µmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>.

### 2.3. Indução de calos

Os Calos de *Tabebuia heptaphylla* foram induzidos a partir de sementes oriundas de frutos imaturos, em diferentes estágios de desenvolvimento, com 55, 60, 65 e 70 dias após a floração (contados a partir da abertura do botão floral). Os frutos foram lavados abundantemente com detergente neutro e água corrente e submetidos ao processo de desinfecção, com imersão em etanol 70% por 5 minutos e posterior imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar.

Após esse processo, as sementes foram removidas e introduzidas em placas de Petri esterilizadas e descartáveis (90 x 15 mm), contendo 25 ml de meio de cultura WPM, suplementados com 2,4-D ou Picloram nas concentrações de 0; 2; 4; 8 e 16 µM.

As culturas foram mantidas no escuro e a avaliação foi realizada após 30 dias de cultura *in vitro*, consistindo na determinação da porcentagem de formação de calos. Foram utilizadas 5 repetições com 20 sementes para cada tratamento.

Após 30 dias em meio de indução, os calos formados a partir dos sementes imaturas, foram transferidos para o meio de regeneração WPM, suplementado com

0; 1,11 e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP. Foram utilizados 4 repetições com 10 calos cada. A avaliação consistiu na determinação da porcentagem de regeneração.

Os dados foram previamente transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{\%}$  e submetidos à Análise de Variância Multifatorial, com separação das médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Gomez e Gomez, 1984).

#### **2.4. Crescimento dos calos**

Os calos obtidos de sementes imaturas de *Tabebuia heptaphylla* com 55 dias de idade, conforme metodologia descrita no **item 2.3.**, após 30 dias de indução à calogênese em meio de cultura WPM suplementado com 2,4-D nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ , foram repicados para meio de cultura de mesma composição e mantidos no escuro.

O crescimento dos calos foi monitorado, a cada 7 dias, através da determinação do diâmetro. Foram utilizados 40 calos para cada tratamento. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (Anova), com separação das médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Gomez e Gomez, 1984)

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Indução de calos

A análise de variância multifatorial não indicou interação entre os fatores idade do fruto e a concentração do regulador de crescimento, sobre a porcentagem de formação de calo, tanto nos tratamentos com 2,4-D, como nos tratamentos com Picloram.

As porcentagens de formação de calos induzidos por 2,4-D e Picloram não foram significativamente diferentes entre as idades dos frutos exceto na presença de 2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 4  $\mu\text{M}$  de Picloram (**Tabela 4 e 5**). Na presença de 2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, as sementes oriundas de frutos com 55 dias de idade (contados a partir da abertura do botão floral), apresentaram porcentagem de formação de calos superior as sementes com 65 dias, porém quando não apresentou diferenças quando comparados as demais idades (**Tabela 4**). O tratamento com 4  $\mu\text{M}$  de Picloram resultou em porcentagem de formação de calos superior em sementes com 55 dias (**Tabela 5**). O meio de cultura com 4 e 8  $\mu\text{M}$  de 2,4-D induziu a maior porcentagem de formação de calos para todas as idades (**Tabela 4**). Já em meio com Picloram, as concentrações de 8 e 16  $\mu\text{M}$  resultaram na maior porcentagem de formação de calos para embriões com 60, 65 e 70 dias. Embriões com 55 dias não difeririam estatisticamente na porcentagem de formação de calos na presença de 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ . A utilização de 2  $\mu\text{M}$  de Picloram no meio de cultura, demonstrou não ser eficaz para a calogênese, apresentando 100% de oxidação sem a formação de calo (**Tabela 5**).

Os calos originados não apresentaram diferenças quanto ao grau de rigidez e a coloração, em função dos tratamentos. Os calos produzidos se caracterizaram por ser friáveis e de cor branca, tornando-se amarelados com o aumento dos dias de cultura (**Figura 14**).

Após 30 dias em meio de regeneração (meio de cultura WPM suplementado com 0; 1,11 e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP), não foi observado formação de brotos ou formação de embriões a partir dos calos formados.

**Tabela 4.** Formação de calos a partir de sementes imaturas de *Tabebuia heptaphylla* em meio de cultura WPM, suplementado com 2,4-D nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ .

<b>Sementes que originaram calos (%)</b>						
<b>Idade do Embrião**</b>	<b>Concentração de 2,4-D (<math>\mu\text{M}</math>)*</b>					<b>Média</b>
	<b>0*</b>	<b>2*</b>	<b>4*</b>	<b>8*</b>	<b>16*</b>	
<b>70 dias</b>	2Aa	26ABb	66Ac	58Ac	32Ab	36,8A
<b>65 dias</b>	2Aa	20Ab	64Ac	50Ac	22Ab	31,6A
<b>60 dias</b>	4Aa	28ABb	66Ac	54Ac	26Ab	35,6A
<b>55 dias</b>	8Aa	36Bb	68Ac	60Ac	14Aa	37,2A
<b>Média</b>	4a	27,5b	66d	55,5c	23,5b	

\*Media de 5 repetições com 20 sementes cada. Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

\*\*Dias após a abertura do botão floral.

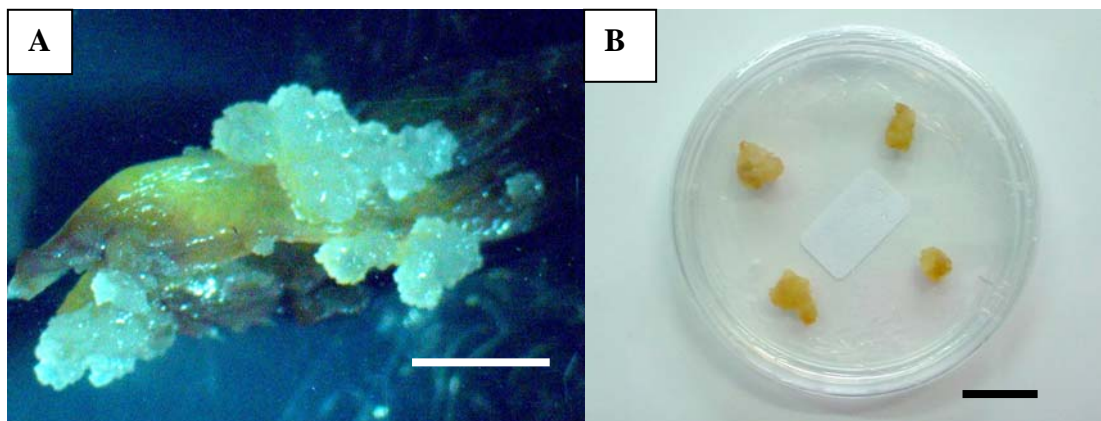
**Tabela 5.** Formação de calos a partir de sementes imaturas de *Tabebuia heptaphylla* em meio de cultura WPM, suplementado com Picloram nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ .

<b>Sementes que originaram calos (%)</b>						
<b>Idade do Embrião**</b>	<b>Concentração de Picloram (<math>\mu\text{M}</math>)*</b>					<b>Média</b>
	<b>0**</b>	<b>2**</b>	<b>4**</b>	<b>8**</b>	<b>16**</b>	
<b>70 dias</b>	2Aa	0Aa	2Aa	16Ab	24Ab	8,8A
<b>65 dias</b>	2Aa	0Aa	2Aa	14Ab	22Ab	8A
<b>60 dias</b>	4Aa	0Aa	6ABab	16Abc	28Ac	10,8AB
<b>55 dias</b>	8Ab	0Aa	18Bbc	22Abc	28Ac	15,2B
<b>Média</b>	4b	0a	7b	17c	25,5d	

\*Media de 5 repetições com 20 sementes cada. Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

\*\*Dias após a abertura do botão floral.





**Figura 14.** Calos originados a partir de sementes imaturas de *Tabebuia heptaphylla*. (A) Formação dos calos em meio de cultura WPM suplementado com 4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Barra = 3 mm. (B) Calos repicados, após 45 dias de indução a sua formação, em meio WPM com 4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Barra = 20 mm.

### 3.2. Crescimento dos calos

Os resultados demonstraram que houve interação entre o tempo de cultura e a concentração do regulador de crescimento. Sete dias após a repicagem, os calos expostos às diferentes concentrações de 2,4-D, não diferiram significativas quanto ao diâmetro. Essas diferenças foram reveladas 14 dias após a repicagem, apontando um diâmetro estatisticamente superior para os calos expostos à concentração de 2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (**Tabela 6**).

Após 21 dias, a diferença entre os diâmetros dos calos aumentou. Calos em meio de cultura com 2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D continuaram apresentando maior diâmetro (16,69 mm). O tratamento com 4  $\mu\text{M}$  resultou em calos com diâmetro superior (15,39 mm) aos tratamentos com 0, 8 e 16  $\mu\text{M}$  (11,44; 14,34 e 13,50 mm respectivamente) (**Tabela 6**).

Os calos em meio de cultura sem 2,4-D, apresentaram diâmetro menor aos que receberam a auxina (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Diâmetro dos calos (mm) formados a partir de embriões imaturos com 55 dias de idade de *Tabebuia heptaphylla*, com 0, 7, 14 e 21 dias em meio gelificado WPM suplementado com 0, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Concentração de 2,4-D (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Diâmetro do calo*</b> (mm)
<b>0</b>	<b>0</b>	8,20 a
	<b>2</b>	8,14 a
	<b>4</b>	8,22 a
	<b>8</b>	8,26 a
	<b>16</b>	7,78 a
<b>7</b>	<b>0</b>	9,14 abc
	<b>2</b>	9,86 bc
	<b>4</b>	8,74 ab
	<b>8</b>	9,08 abc
	<b>16</b>	8,99 abc
<b>14</b>	<b>0</b>	10,03 bcd
	<b>2</b>	12,83 f
	<b>4</b>	11,32 de
	<b>8</b>	9,99 bcd
	<b>16</b>	10,23 cde
<b>21</b>	<b>0</b>	11,44 e
	<b>2</b>	16,69 i
	<b>4</b>	15,39 h
	<b>8</b>	14,34 gh
	<b>16</b>	13,50 fg

\*Média de 40 calos por tratamento. Valores seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

#### 4. DISCUSSÃO

As sementes fisiologicamente imaturas de *Tabebuia heptaphylla*, oriundas de frutos com 55, 60, 65 e 70 dias (após a floração), apresentaram potenciais de formação de calos semelhantes (**Tabela 4 e 5**), o que pode indicar que as sementes estavam em estágios de desenvolvimento semelhante, provavelmente as sementes já haviam iniciado o estágio de maturação.

Apenas no tratamento com 2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 8  $\mu\text{M}$  de Picloram, os resultados apontaram uma tendência de maior produção de calos quanto menor a idade da semente (**Tabela 4 e 5**). Segundo George (1993) e Hu e Ferreira (1998), explantes de tecidos jovens continuam a divisão celular e geralmente formam calos em cultura *in vitro*, mais facilmente que os explantes mais velhos.

A presença de auxina afetou positivamente na produção de calos em sementes imaturas de *T. heptaphylla* (**Tabela 4 e 5**). Rodrigues-Otubo *et al.* (2000), após testar meios de cultura, com suplementação de diversas combinações de 2,4-D, ANA, AIA, BAP e cinetina, em cultura de embriões de *Brachiaria spp.*, constataram que apenas os meios suplementados com 2,4-D induziram a formação de calos. Lee *et al.* (2002) relataram que, para embriões maduros de *Oryza sativa*, a presença de 2,4-D no meio de cultura é crítica para a indução de calos, sendo que estes não são induzidos na ausência de 2,4-D.

Os calos formados aparentemente não possuíam potencial embriogênicos, uma vez que não foi observada sua capacidade regenerativa dos calos. Lee *et al.* (2002) reportam que apesar de 90-97% dos embriões de *Oryza sativa* terem formado calos em meio com 3  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D, a porcentagem de calos embriogênicos foi de apenas 30-56%. Esses dados fortalecem a hipótese de que as sementes já haviam iniciado o estágio de maturação. Segundo George (1993) e Hu e Ferreira (1998) os calos produzidos por embriões imaturos possuem maiores chances de apresentarem potencial organogênico, enquanto que calos produzidos por embriões maduros, freqüentemente não demonstram potencial morfogenético. Zale, *et al.*(2004), relataram que embriões imaturos de *Triticum sp.* possuem capacidades regenerativas superiores aos embriões maduros.

Outro fator que pode ter sido decisivo no resultado que apontou a ausência de regeneração, é o tempo de exposição às auxinas, já que o desenvolvimento de gemas adventícias e embriões somáticos, depois da indução, é inibido por 2,4-D e

Picloram (Hu e Ferreira, 1998). George (1993) afirma que o tempo de cultura dos calos em meio de indução influencia no seu potencial morfogênético. Geralmente, quanto menor o tempo de cultura, maior a habilidade regenerativa (George, 1993).

Os calos mantidos na presença de 2,4-D após os 45 dias de indução, repicados a cada 7 dias, tiveram o seu crescimento afetado pelas concentrações de 2,4-D (**Tabela 6**). A ausência da auxina resultou em menor crescimento dos calos. Esse resultado confirma a premissa que a auxina promove o alongamento celular e o crescimento dos calos (George, 1993; Taiz e Zeiger, 2004). De acordo com os resultados (**Tabela 6**), o crescimento dos calos aumentou com a adição de 2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, porém ao aumentar a concentração da auxina acima desse valor, houve a diminuição no crescimento dos calos. Isso provavelmente ocorreu porque o estímulo à divisão celular é realizado pela auxina em combinação com citocininas. Concentrações elevadas de 2,4-D desestabilizaram o balanço hormonal (razão auxina/citocinina) ótimo para o crescimento. Geralmente, em cultura de tecidos de dicotiledôneas, além das auxinas, citocininas também são adicionadas ao meio de cultura (George, 1993; Hu e Ferreira, 1998; Taiz e Zeiger, 2004). Rodrigues-Otubo (2000), induziu o crescimento de calos a partir de embriões imaturos de *Brachiaria spp.* combinando 2,4-D e BAP a 9,05 e 8,87  $\mu\text{M}$  respectivamente.

## 5. CONCLUSÕES

Sementes imaturas de *Tabebuia heptaphylla*, são bons explantes para iniciar a cultura de calos, quando estimuladas pela presença de 4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Porém a auxina e o tempo de indução de 45 dias, avaliado nesse experimento, não foram adequados para garantir o potencial organogênico das culturas. Assim esse protocolo foi eficiente para a formação de calos, mas não foi eficaz para a propagação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ UFSC, 1999.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture (Part 1) The Technology**. 2 ed. Edington: Exegetics Limited 574p. 1993.

GOMES, K. K.P.; OLIVEIRA, V. C.; LEDO, A. S. *et al.* Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, n. 1, p. 124-126, 2004.

GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. **Statistical Procedures for Agricultural Research**. Singapore: John Wiley & Sons, 660p., 1984.

HU, C.Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds. ) – **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, p.371-393, 1998.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds. ) – **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v. 2, p.519-531, 1998.

KIM, S. W.; IN, D. S.; CHOI, P. S.; LIU, J. R. Plant regeneration from immature zygotic embryo-derived embryogenic calluses and cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 76: 131-135, 2004.

LEE, K.; JEON, H.; KIM, M. Optimization of a mature embryo-based *in vitro* culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from *Japonica rice* cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 71, p. 237-244, 2002.

RODRIGUES-OTUBO, B. M.; PENTEADO, M. I.; VALLE, C. B. Embryo rescue of interspecific hybrids of *Brachiaria spp.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 61, p. 175-182, 2000.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU, Ed. da Universidade de São Paulo, 1976.

STAFFORD, A.; WAREN, G. **Plant cell and tissue culture: the biotechnology series**. Boca Raton: University Press, 251p. 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba. 317p., 1997.

VEASEY, E. A.; VIEIRA, M. L.; BANDEL, G. Tissue culture in Gramineae, with emphasis on forage grasses. **Ciência e Cultura**, v. 43, p. 36-43, 1991.

ZALE, J. M.; BORCHARDT-WIER, H.; KIDWELL, K. K.; STEBER, C. M. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. N. 76, p. 277-281, 2004.

# EFEITO DE BAP (6-BENZILAMINOPURINA) E CIN (6-FURFURILAMINOPURINA) NA MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Tabebuia heptaphylla* (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)

## 1. INTRODUÇÃO

Os estudos abordando a cultura de tecidos têm gerado grandes avanços para a biotecnologia. Além disso, as técnicas de cultura *in vitro* para micropropagação, tem sido uma importante ferramenta para multiplicação de espécies agrícolas e florestais. (George, 1993; Kerbauy<sup>a</sup>, 1998).

Os meios de cultura são elaborados e adaptados às necessidades nutricionais de cada planta (genótipo), respeitando as interações entre os seus componentes, sendo o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968) usados para a cultura *in vitro* da maioria das espécies. Para as espécies lenhosas, o meio de cultura WPM (Lloyd e MacCown, 1981) tem sido utilizado com frequência (Caldas *et al.*, 1998).

O controle da morfogênese *in vitro* é regulado pelos reguladores de crescimento, principalmente pela razão auxina:citocinina. Esse balanço pode ser manipulado para regular o crescimento e a formação de órgãos, levando em consideração a concentração endógena do explante.

Skoog e Miller (1965 *apud* Taiz e Zeiger, 2004), demonstraram que em calos de tabaco, expostos a baixas concentrações de auxina e altas de citocinina, ocorre a formação de gemas, enquanto que os calos expostos à alta concentração de auxina e baixa de citocinina formam raízes. Em concentrações intermediárias ou altas de auxina e citocinina, há o crescimento de calos não diferenciados (George, 1993; Caldas *et al.*, 1998; Taiz e Zeiger, 2004).

Saini e Jaiwal (2002) relataram a regeneração de brotos em segmentos apicais e nós cotiledonares em meio de cultura com BAP e a formação de calos, quando estes eram expostos a combinações de BAP e auxinas (AIA, ANA e AIB). Hiregoudar *et al.* (2003) reportaram que segmentos nodais de *Feronia limonia* (L.), em meio de cultura MS suplementado com 5  $\mu$ M de BAP, apresentaram 100% de regeneração e média de 7,33 brotos formados por explantes.

O número de artigos científicos publicados referentes a *Tabebuia heptaphylla* ainda é reduzido e sem registros para trabalhos relacionados à cultura *in vitro*, havendo assim a necessidade da realização de novos estudos.

Alguns trabalhos abordando a cultura *in vitro* de espécies da família Bignoniaceae tem sido publicados. Lisowska e Wysokinska (2000) realizaram um estudo da propagação *in vitro* de *Catalpa ovata* G. Don. relatando a regeneração de brotações em cotilédones, através da organogênese em meio com 0,6  $\mu\text{M}$  de AIA; 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP e 22,8  $\mu\text{M}$  de zeatina. Os autores demonstraram também que os brotos de as plantas micropropagadas exibiam o mesmo padrão de compostos orgânicos apresentado pelas folhas das plantas matrizes.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Preparação dos meios de culturas e reguladores de crescimento

Todos os meios de cultura utilizados nos experimentos deste trabalho foram suplementados com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel e BAP ou CIN em diferentes concentrações. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem que ocorreu por 18 minutos a 120<sup>o</sup>C. Os reguladores de crescimento foram dissolvidos em NaOH 0,1M e solubilizados em água destilada.

### 2.2. Condições de cultura

As culturas foram mantidas em sala de crescimento do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do CCA/UFSC, à temperatura controlada de 25 ± 2<sup>o</sup>C e expostas ao fotoperíodo de 16 horas, através de lâmpadas fluorescentes Sylvânia que forneciam 40 µmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>.

### 2.3. Histologia da região dos nós de caule de *Tabebuia heptaphylla*

Para a determinação do número de gemas pré-formadas, existente em cada nó, foram realizadas secções longitudinais do caule de plantas *in vitro* e *ex vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 70 dias de idade.

As plantas *in vitro* foram originadas da germinação de sementes em meio de cultura MS suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel. As plantas *ex vitro* foram originadas da germinação das sementes em copos plásticos (300 mL), contendo uma mistura de argila e composto orgânico na proporção de 1:1.

As secções foram realizadas a fresco, na região dos nós cotiledonares e foliares e montados sob lâmina de vidro em gelatina glicerizada (Ruzin, 1999).

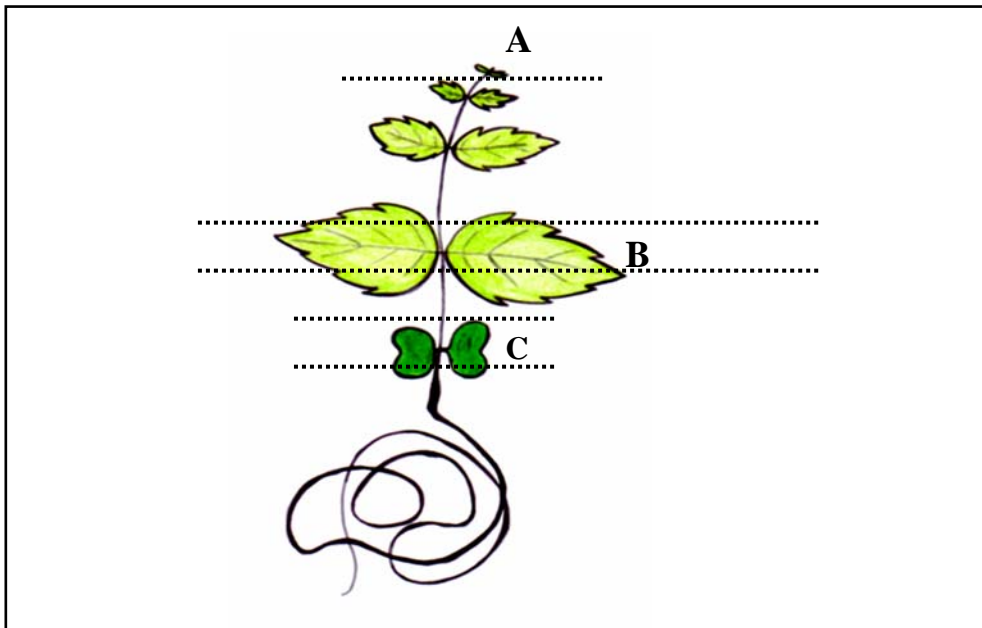
### 2.4. Cultura de segmentos caulinares

O estudo do efeito de BAP e CIN em diferentes tipos de explantes foi realizado com o uso de segmentos, com aproximadamente 1,0 cm; do caule de planta *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla*, com 2 meses de idade, contendo a gema apical, o primeiro nó foliar e o nó cotiledonar (**Figura 15**).

Esses segmentos nodais foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio (20 x 150 mm), com 8 ml de meio MS, suplementado com BAP ou CIN nas concentrações de 0, 1, 2 e 4 µM.

A avaliação foi realizada após 70 dias e consistiu na determinação da porcentagem de explantes que sofreram expansão de seu tecido; de formação de brotos e de calos; de explantes que oxidaram e na determinação das massas fresca e seca da cultura; do número de brotos por explante; do comprimento do maior broto e do número de nós originados de cada explante.

Foram utilizados 4 repetições com 10 explantes para cada tratamento. Os dados foram previamente transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{\%}$  e submetidos à Análise de Variância Multifatorial, com separação das médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Gomez & Gomez, 1984).



**Figura 15.** Desenho esquemático de planta crescida *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla*. (A) Segmento de caule contendo a gema apical. (B) Segmento de caule contendo o primeiro nó foliar. (C) Segmento de caule contendo o nó cotiledonar. Tracejado = incisão do explante.

## 2.5. Cultura de raízes

O efeito de BAP e CIN nas culturas de raízes, foi estudado, utilizando-se segmentos apicais de raízes medindo aproximadamente 5,0 cm de comprimento de planta *in vitro*, com 2 meses de idade.

Os segmentos foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio (20 x 150 mm), com 8 ml de meio MS, suplementado com BAP ou cinetina nas concentrações de 0, 1, 2 e 4  $\mu\text{M}$

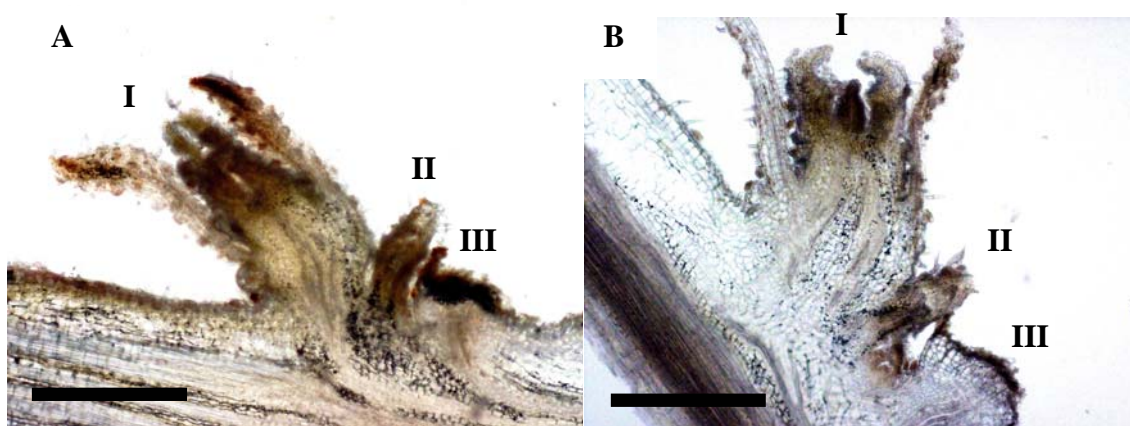
A avaliação foi realizada após 70 dias de cultivo, consistindo na determinação da porcentagem de formação de calos, na porcentagem de explantes de raízes que continuaram o seu crescimento e de explantes oxidados.

Foram utilizados 4 repetições com 10 explantes para cada tratamento. Os dados foram previamente transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{\%}$  e submetidos à Análise de Variância Multifatorial, com separação das médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Gomez & Gómez, 1984)

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Histologia da região dos nós de caule de *Tabebuia heptaphylla*

As secções histológicas do caule de plantas com 70 dias de idade, crescidas *in vitro* e *ex vitro*, mostraram a existência, de mais de uma gema axilar pré-formada, na base de cada folha (foi visualizado até 2 gemas pré-formadas). Como as plantas dessa espécie possuem folhas opostas, com cada nó apresentando duas folhas dispostas em lados opostos, a região de cada nó foliar ou cotiledonar, apresentava mais do que 2 gemas pré-formadas (**Figura 16**).



**Figura 16.** Corte longitudinal do caule de *Tabebuia heptaphylla* com 70 dias de idade. (A) Gemas axilares de plantas crescidas *in vitro*. (B) Gemas axilares de plantas crescidas *ex vitro*. (I) Primeira gema axilar pré-formada. (II) Segunda gema axilar pré-formada. (III) Corte do pecíolo da folha. Barra = 500  $\mu$ m.

#### 3.2. Cultura de segmentos caulinares.

A análise de variância multifatorial não indicou interação significativa entre o tipo de regulador de crescimento, a concentração e o tipo de explante na determinação da porcentagem de oxidação. Para as gemas apicais, não houve oxidação dos explantes na ausência de regulador de crescimento ou na presença de BAP. Esse evento ocorreu apenas na presença de cinetina, sendo que as culturas na presença de 1 e 4  $\mu$ M de cinetina apresentaram porcentagem de oxidação significativamente superior aquela observada com 2  $\mu$ M de CIN (**Tabela 7**).

Em relação ao nó foliar, não houve diferença, na porcentagem de oxidação entre as culturas sem regulador de crescimento e com BAP. Explantes na ausência

de regulador de crescimento diferiu na porcentagem de oxidação, apenas para os explantes na presença de 1  $\mu\text{M}$  de cinetina (**Tabela 7**).

Em ausência de regulador de crescimento, a porcentagem de oxidação diferiu estatisticamente entre os tipos de explante, sendo que o nó cotiledonar promoveu a maior porcentagem de explantes oxidados (**Tabela 7**).

A maior porcentagem de oxidação foi observada em nó foliar na presença de cinetina a 1  $\mu\text{M}$  (47,5%), diferindo estatisticamente do valor obtido nos demais tratamentos, tanto na comparação entre os tipos de explantes, com entre as condições de cultura. (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Efeito do BAP e da CIN em diferentes concentrações, após 60 dias de cultura *in vitro*, na porcentagem de explantes oxidados.

Tipo de Explante**	Explantes oxidados (%)							Média
	BAP ( $\mu\text{M}$ )				KIN ( $\mu\text{M}$ )			
	0*	1*	2*	4*	1*	2*	4*	
<b>Apical</b>	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	10Ac	5Ab	7,5Abc	3,21A
<b>Foliar</b>	10,0Bab	10,0Bab	12,5Bab	7,5Ba	47,5Cc	17,5Bb	12,5ABab	16,79B
<b>Cotiledonar</b>	27,5Cd	7,5Bb	0Aa	10,0Bbc	22,5Bd	7,5Abb	17,5Bcd	13,21B
<b>Média</b>	12,50b	2,50ab	4,17a	5,83ab	26,67c	10ab	12,5b	

\*Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste Duncan.

\*\*Explantes excisados de caule de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 2 meses de idade, contendo a gema apical e os nós foliares e cotiledonares.

A análise de variância multifatorial indicou interação significativa entre os fatores: tipo de regulador de crescimento; concentração; e tipo de explante para as porcentagens de expansão do caule e de formação de calos e brotos (**Tabela 8 e apêndice C**).

Os três tipos de explante, não expandiram o caule, sem a presença de regulador de crescimento no meio de cultura. O mesmo ocorreu com os segmento apical na presença de 1  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 8**).

Os nós cotiledonares em cultura com 4  $\mu\text{M}$  de BAP e 2 e 4  $\mu\text{M}$  de cinetina, apresentaram porcentagem de expansão do caule superior aos demais tratamentos. (**Tabela 8**).

A maior porcentagem de expansão dos caule (62,5%) foi promovido pelas culturas de nó foliar na presença de 4  $\mu\text{M}$  de cinetina (**Tabela 8**).

Assim como na expansão dos caules, o meio de cultura sem regulador de crescimento não promoveu a formação de calos. A maior porcentagem de formação de calos foi promovida pelo nó apical na presença de 2 e 4  $\mu\text{M}$  de BAP e de 2  $\mu\text{M}$  de cinetina e pelo nó foliar na presença de 4  $\mu\text{M}$  de BAP. O nó cotiledonar obteve maior porcentagem de formação de calo na presença de 1  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 8**).

Na ausência de regulador de crescimento, o nó foliar promoveu a menor porcentagem formação de brotos em relação aos demais explantes. Os nós apicais apresentaram porcentagens de formação de brotos estatisticamente superiores aos nós foliares e cotiledonares, em todas as concentrações de BAP e cinetina, exceto na presença de 1 e 4  $\mu\text{M}$  de BAP que apesar do nó apical promover maior porcentagem de formação de brotos em relação aos nós cotiledonares, não diferiu do valor obtido pelo nó foliar (**Tabela 8**).

A menor porcentagem de formação de brotos foi obtida pelo nó foliar na ausência de regulador de crescimento (40%) e na presença de 1  $\mu\text{M}$  de CIN (42,5%). Já o nó apical na presença de 2  $\mu\text{M}$  de BAP promoveu a maior porcentagem de brotação (100%) (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Respostas morfogênicas de segmentos caulinares contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares, com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultura em meio MS contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.

<b>Regulador de Crescimento</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Tipo de Explante</b>	<b>Expansão do caule (%)*</b>	<b>Formação de Calos (%)*</b>	<b>Formação de brotos (%)*</b>
<b>controle</b>	<b>0</b>	Apical	0 a	0 a	60,0 b
		Foliar	0 a	0 a	40,0 a
		Cotiledonar	0 a	0 a	62,5 bc
<b>BAP</b>	<b>1</b>	Apical	0 a	60,0 f	90,0 gh
		Foliar	20,0 de	70,0 g	90,0 gh
		Cotiledonar	10,0 c	80,0 h	92,5 h
	<b>2</b>	Apical	10,0 c	90,0 i	100 i
		Foliar	20,0 de	67,5 g	87,5 fgh
		Cotiledonar	50,0 fg	50,0 e	87,5 fgh
<b>4</b>	Apical	7,5 bc	90,0 i	87,5 fgh	
	Foliar	7,5 bc	87,5 i	87,5 fgh	
	Cotiledonar	20,0 de	50,0 e	80 def	
<b>CIN</b>	<b>1</b>	Apical	27,5 e	30,0 d	72,5 cd
		Foliar	20,0 de	22,5 c	42,5 a
		Cotiledonar	25,0 de	32,5 d	55,0 b
	<b>2</b>	Apical	5,0 b	90,0 i	92,5 h
		Foliar	22,5 de	47,5 e	77,5 de
		Cotiledonar	55,0 gh	32,5 d	85 efg
<b>4</b>	Apical	17,5 d	62,5 f	90 gh	
	Foliar	62,5 h	15,0 b	77,5 de	
	Cotiledonar	42,5 f	32,5 d	75 d	

\*Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Duncan.

Em relação à massa fresca e seca e teor de água das culturas, não houve interação entre os fatores: tipo de regulador de crescimento, concentração e tipo de explante. Na presença de regulador de crescimento, as massas frescas das culturas não apresentaram diferenças estatísticas entre os tipos de explante, exceto na presença de 2  $\mu\text{M}$  de cinetina. Nessas condições o nó cotiledonar apresentou massa fresca estatisticamente inferior em relação aos demais tipos de explante. Na ausência de regulador de crescimento os resultados para os nós foliares e cotiledonares, não diferiram entre si para massa fresca, porém ambos foram significativamente superiores ao nó apical (**Tabela 9**).

Para os três tipos de explante, a presença de BAP promoveu massa fresca superior ao valor obtido pelas culturas em ausência de regulador de crescimento, não diferindo entre as concentrações. O mesmo não ocorreu às culturas na presença de cinetina, que diferiu dos explantes em ausência de fitorregulador apenas para os nós apicais a 2 e 4  $\mu\text{M}$  e nó cotiledonar a 4  $\mu\text{M}$  (**Tabela 9**).

Em termos de massa seca, as culturas com reguladores de crescimento não apresentaram diferenças entre os tipos de explantes, exceto na presença de 2  $\mu\text{M}$  de cinetina. Nessa concentração, o nó apical apresentou massa seca estatisticamente superior ao nó cotiledonar. Na ausência de BAP, o nó apical não diferiu do nó foliar, porém ambos foram estatisticamente inferiores ao nó cotiledonar quanto a massa seca.

Para o nó apical e foliar, a presença de regulador de crescimento afetou a massa seca, resultando em valores superiores aos obtidos em culturas na ausência do regulador de crescimento. O nó cotiledonar apresentou o mesmo comportamento, exceto na presença de cinetina a 1 e 2  $\mu\text{M}$ , que não diferiu estatisticamente do nó cotiledonar sem regulador de crescimento (**Tabela 9**).

Na presença de BAP, não houve diferenças estatísticas entre os tipos de explantes quanto ao teor de água. Em ausência de regulador de crescimento, o nó apical não diferiu dos demais explantes, porém o nó foliar apresentou maior porcentagem de água que o cotiledonar. Para os explantes expostos a cinetina, o nó apical registrou maior teor de água que os outros explantes, exceto para a concentração de 2  $\mu\text{M}$  que apesar de apresentar teor de água superior ao nó cotiledonar, seu valor não diferiu do nó foliar (**Tabela 9**).



**Tabela 9.** Massa da matéria fresca e seca (mg) e o teor de água (%) da cultura de segmentos caulinares contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultura em meio MS contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.

Parâmetros	Tipo de Explante	Regulador de Crescimento							Média
		controle	BAP ( $\mu\text{M}$ )			CIN ( $\mu\text{M}$ )			
			1,11	2,22	4,44	1,16	2,33	4,65	
<b>Massa Fresca* (mg)</b>	Apical	24,70Aa	632,80Ac	692,00Ac	679,89Ac	234,75Aab	456,10Bbc	458,33Abc	457,24A
	Foliar	94,60Ba	756,00Ac	723,88Ac	608,38Abc	161,63Aa	360,00ABab	343,38Aab	434,73A
	cotiledonar	123,60Ba	557,50Ab	481,40Ab	529,33Ab	209,57Aa	186,38Aa	399,44Ab	364,16A
	<b>Média</b>	80,97a	648,77c	625,89c	605,77c	201,65a	343,54b	402,58b	
<b>Massa Seca* (mg)</b>	Apical	3,60Aa	55,70Acde	69,50Ae	65,89Ade	26,63Ab	47,80Bcd	35,78Abc	43,85A
	Foliar	9,30Aa	65,00Ad	62,50Ad	53,25Acd	24,88Aab	39,75ABbc	39,00Abc	41,63A
	cotiledonar	17,00Ba	53,60Ac	48,10Ac	57,44Ac	27,57Aab	26,38Aab	43,89Abc	39,73A
	<b>Média</b>	9,97a	58,10d	59,86d	59,08d	26,30b	38,73c	39,58c	
<b>Teor de Água* (%)</b>	Apical	68,39ABa	72,35Ab	70,83Aab	71,98Ab	70,89Bab	70,94Bab	72,96Bb	71,16B
	Foliar	71,60Bb	72,57Ab	71,89Ab	72,55Ab	66,16Aa	70,32Bb	69,77Ab	70,79AB
	cotiledonar	68,00Aa	72,06Ab	71,63Ab	70,93Ab	68,35Aba	67,33Aa	70,52Ab	69,95A
	<b>Média</b>	69,33a	72,33c	71,42c	71,79c	68,47a	69,64ab	71,13bc	

\*Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste Duncan.

Quanto ao número de brotos originados em cada explante, houve interação entre o tipo e concentração de regulador de crescimento e o tipo de explante (**Tabela 10**).

Na ausência de regulador de crescimento, não foram observadas diferenças no número de brotos entre os tipos de explante (**Tabela 10**). Para os nós apicais o regulador de crescimento não afetou o número de brotos. O mesmo não ocorreu nos demais explantes. Os nós foliares, na presença de BAP e cinetina, apresentaram maior número de brotos que as culturas em ausência de regulador de crescimento, com exceção das culturas em presença de 1 e 4  $\mu\text{M}$  de cinetina,. Para os nós cotiledonares, a presença de BAP promoveu maior número de brotos em relação às culturas em ausência de regulador de crescimento e em presença de cinetina, que por sua vez, não diferiram estatisticamente entre si (**Tabela 10**). O maior número de brotos foi obtido pelos nós foliares na presença de 1 e 2  $\mu\text{M}$  de BAP e pelo nó cotiledonar na presença de 2  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 10**).

**Tabela 10.** Número de brotos por explante, obtido a partir da cultura de segmentos caulinares, contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares, com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.

Regulador de Crescimento	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Tipo de Explante	Número de brotos por explante*
controle	0	Apical	1,00 a
		Foliar	1,70 ab
		Cotiledonar	1,5 ab
BAP	1	Apical	1,56 ab
		Foliar	4,33 e
		Cotiledonar	3,40 d
	2	Apical	1,10 a
		Foliar	4,25 e
		Cotiledonar	3,50 de
4	Apical	1,5 ab	
	Foliar	3,00 d	
	Cotiledonar	2,88 cd	
CIN	1	Apical	1,00 a
		Foliar	1,38a b
		Cotiledonar	1,00 a
	2	Apical	1,20 ab
		Foliar	2,13 bc
		Cotiledonar	1,00 a
4	Apical	1,13 a	
	Foliar	1,88 ab	
	Cotiledonar	1,56 ab	

\*Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

Não houve interação entre os fatores tipo de regulador de crescimento, concentração e tipo de explante para o comprimento do broto e o número de nós (**Tabela 11**).

Os resultados mostraram que o comprimento dos brotos foi semelhante estatisticamente para todos os tipos de explantes, para as culturas em ausência ou presença de BAP e cinetina (**Tabela 11**). Apenas na presença de BAP a 1 e 2  $\mu\text{M}$  e de cinetina a 2  $\mu\text{M}$ , o nó apical apresentou diferenças significativas em relação as culturas na ausência de regulador de crescimento. Para o nó foliar, somente a presença de 2  $\mu\text{M}$  de BAP promoveu comprimento do broto superior as aos dos explantes em ausência de BAP ou CIN. Entre os nós cotilédonares a ausência ou a presença de BAP e CIN não afetou no comprimento do broto (**Tabela 11**).

Na presença de BAP a 1  $\mu\text{M}$  e cinetina a 1  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$ , o número de nós não apresentou diferenças entre os tipos de explantes. Na ausência de regulador de crescimento, o nó foliar não diferiu do nó cotilédonar e ambos foram estatisticamente superiores ao nó apical. O mesmo ocorreu para as culturas na presença de BAP a 2  $\mu\text{M}$  e cinetina a 4  $\mu\text{M}$ . O nó cotilédonar, na presença de 4  $\mu\text{M}$  de BAP, não diferiu significativamente do nó apical e ambos apresentaram valores inferiores ao nó foliar. Para o nó apical, a presença de BAP ou cinetina promoveu maior número de nós que os explantes em ausência dos reguladores de crescimento, exceto a 4  $\mu\text{M}$  de BAP e 1  $\mu\text{M}$  de cinetina que apresentaram valores semelhantes. Quanto aos nós foliares, apenas os explantes mantidos em meios com 1  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$  de BAP promoveram maior número de nós em relação aos explantes mantidos sem BAP no meio de cultura. Para os nós cotilédonares, o número de nós foi estatisticamente semelhante na presença ou ausência de BAP e CIN (**Tabela 11**).

**Tabela 11.** Comprimento do broto e o número de nós dos brotos originados da cultura de segmentos caulinares contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.

Parâmetros	Tipo de Explante	Regulador de Crescimento							Média
		controle	BAP ( $\mu\text{M}$ )			CIN ( $\mu\text{M}$ )			
			1,11	2,22	4,44	1,16	2,33	4,65	
<b>Comprimento do broto* (mm)</b>	Apical	8,10Aa	27,22Ab	21,00Ab	12,63Aa	13,13Aa	21,20Ab	13,50Aa	16,86A
	Foliar	10,80Aa	19,33Aab	23,38Ab	10,63Aa	12,38Aab	17,75Aab	21,13Aab	16,34A
	Cotiledonar	15,60Aa	19,40Aa	17,63Aa	12,25Aa	18,14Aa	16,50Aa	22,00Aa	17,43A
	<b>Média</b>	11,50a	21,89c	20,69c	11,83a	14,39ab	18,69bc	19,00bc	
<b>Número de nós*</b>	Apical	1,70Aa	4,78Ad	3,70Acd	2,25Aab	2,25Aab	3,50Ac	3,00Abc	3,05A
	Foliar	3,80Bab	6,78Abc	8,13Bc	5,13Babc	3,37Aa	4,50Aab	4,75Bab	5,19C
	Cotiledonar	3,90Bab	5,20Aab	5,63ABb	4,13Abab	3,43Aa	3,38Aa	4,56Bab	4,35B
	<b>Média</b>	3,13a	5,57b	5,65b	3,83a	3a	3,77a	4,12a	

\* Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste Duncan.

### 3.3. Cultura de Raízes

Em culturas de segmentos de raízes, foi observado o crescimento em comprimento de alguns explantes e a formação de calos a partir de alguns segmentos radiculares. Foi verificado também que houve oxidação dos explantes (**Tabela 12 e apêndice D**). A análise de variância multifatorial indicou interação significativa entre os fatores tipo de regulador de crescimento e concentração (**Apêndice D**).

A presença de BAP a 1  $\mu\text{M}$  promoveu a menor porcentagem de segmentos de raízes que continuaram o seu crescimento (5%). Na ausência de regulador de crescimento e na presença de 2  $\mu\text{M}$  de BAP e 1  $\mu\text{M}$  de cinetina, as culturas apresentaram valores semelhantes. Segmentos radiculares na presença de 4  $\mu\text{M}$  de BAP e de 4  $\mu\text{M}$  de cinetina não diferiram entre si. A maior porcentagem de explantes que cresceram (65%) foi obtida na presença de cinetina a 2  $\mu\text{M}$ .

A menor porcentagem de formação de calos foi obtida na presença de 1 e 2  $\mu\text{M}$  de cinetina. Já na presença de BAP a 1  $\mu\text{M}$  houve a maior porcentagem de formação de calos (75%). A presença de BAP a 2  $\mu\text{M}$  apresentou valores semelhantes aos obtidos na ausência de fitorregulador. Na presença de 4  $\mu\text{M}$  de BAP e de 4  $\mu\text{M}$  de cinetina, as culturas não diferiram estatisticamente quanto à formação de calos (**Tabela 12**).

Quanto à oxidação dos explantes, apenas na presença de 1  $\mu\text{M}$  de BAP e 1  $\mu\text{M}$  de cinetina, os segmentos de raízes apresentaram porcentagem de oxidação inferior aos obtidos na ausência dos reguladores de crescimento, nas demais concentrações de BAP e cinetina não houve diferenças significativas entre os valores (**Tabela 12**).

**Tabela 12.** Respostas morfogênicas (%) obtidas a partir da cultura de raízes excisadas de plantas produzidas *in vitro* com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.

<b>Regulador de Crescimento</b>	<b>Concentração (µM)</b>	<b>Explantes que cresceram*</b>	<b>Formação de Calos*</b>	<b>Explantes oxidado*</b>
<b>Controle</b>	-	30 c	25 b	40 bc
<b>BAP</b>	1	5 a	75 d	17,5 a
	2	20 bc	20 b	55 c
	4	15 b	45 c	30 ab
<b>CIN</b>	1	30 c	0 a	47,5 bc
	2	65 d	2,5 a	55 abc
	4	10 b	50 c	40 bc

\*Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Morfogênese a partir de segmentos caulinares

Segmentos de caule de *Tabebuia heptaphylla*, contendo a gema apical e os nós foliar e cotiledonar, foram excelentes fontes de explante para propagação *in vitro*, com alta porcentagem de formação de brotos mesmo na ausência de citocinina exógena e baixa porcentagem de explantes oxidados (**Tabela 7 e 8**). Lisowska e Wysokinska (2000) observaram que, em outra espécie da família Bignoniaceae, a *Catalpa ovata*, segmentos apicais e nodais produziram altas porcentagens de formação de brotos. Esses dados são significativos, visto que as espécies de plantas lenhosas muitas vezes apresentam problemas na regeneração *in vitro* e conseqüentemente na micropropagação, especialmente por serem ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis. A manipulação dos tecidos e as condições *in vitro* podem induzir a oxidação fenólica e essa interação dos compostos fenólicos com os oxigênios livres, expressa através do escurecimento do explante, pode resultar na morte do material vegetal, constituindo em um dos principais problemas enfrentados na cultura *in vitro* (Singh *et al.*, 2002; Anthony *et al.*, 2004).

A adição de BAP e CIN no meio de cultura afetou positivamente a micropropagação. O uso de citocinina na indução de formação de brotos, tem sido freqüente na cultura *in vitro* de segmentos apicais e nodais, visto que estimula a divisão celular, atuando tanto na promoção do crescimento de gemas pré-formadas, como na formação de brotos adventícios através da organogênese direta ou indireta (George, 1993; Taiz e Zeiger, 2004). Morales *et al.* (1999) relataram que a porcentagem de calos regenerativos, o número de brotos e o número de gemas para cultura de internódios de macieira, cv. Gala RW1, foram afetados pela presença de citocinina (BAP e TDZ) e pela sua concentração. Hiregoudar *et al.* (2003) reportaram que segmentos nodais de *Feronia limonia*, não desenvolvem brotos, na ausência de citocinina (BAP, TDZ e CIN).

Os resultados indicaram interação entre o tipo de regulador de crescimento, a concentração e o tipo de explante, na formação de calos e brotos. As culturas em ausência de citocinina não promoveram a formação de calos, mas apresentaram formação de brotos (**Tabela 8**). Contudo, para essas culturas, formação de brotos não



indica necessariamente a ocorrência de organogênese, já que foi verificada a presença de mais de 2 gemas pré-formadas em cada segmento nodal (**Figura 16**). Como o número de brotos dessas culturas não ultrapassou o valor de 2 brotos por explantes, os brotos nesse caso podem ter sido originados a partir do crescimento das gemas pré-existentes.

Os segmentos contendo a gema apical e os nós cotiledonares e foliares, responderam de formas diferentes aos diferentes tratamentos (**Tabela 8 e 9**), indicando capacidade regenerativa e/ou níveis hormonais endógenos distintos. O mesmo já havia sido relatado por Lisowska e Wysokinska (2000) para segmentos nodais e apicais de *Catalpa ovata* em cultura com BAP e AIA.

De acordo com os resultados, o uso de BAP nas culturas foi, na maioria dos tratamentos, mais efetivo na formação de brotos e calos, na massa fresca e seca das culturas e no número de brotos por explantes que a cinetina nas mesmas concentrações (**Tabela 8 e 9**). O melhor desempenho do BAP, em comparação com a cinetina, na formação de brotos adventícios, também foi descrito por Saini e Jaiwal (2002) para cultura de segmentos basal e apical do epicótilo de *Vigna mungo*. Nagori e Purohit (2004), relataram que para *Annona squamosa*, BAP promove com maior eficiência a indução de calos, em relação a cinetina.

Os dados obtidos nos experimentos (**Tabela 8 e 10**) sugerem uma tendência do BAP ser mais eficiente na brotação em menores concentrações. Essa tendência também foi constatada para segmentos de hipocótilo de *Psidium guajava* (Singh *et al.*, 2002). Kim e Jang (2004) relatam que concentrações elevadas de BAP e cinetina causam forte supressão formação de brotos em segmentos apicais de *Drosera peltata*.

Os tipos de explantes expostos ao mesmo tipo e concentração de citocinina apresentaram comprimento do broto semelhante (**Tabela 11**). Esse dado pode indicar que o balanço hormonal dos diferentes explantes seguiu uma tendência de homogeneização durante o tempo de cultura, induzida pelas condições semelhantes do meio de cultura.

#### 4.2. Morfogênese a partir de segmentos radiculares

Na cultura de raízes, alguns explantes (5 - 65%) continuaram o seu crescimento longitudinal, após a excisão da planta matriz (**Tabela 12**), isso porque foi preservado no explante, a região terminal da raiz, com a zona meristemática e zona de alongamento. Acredita-se (Kerbaudy<sup>b</sup>, 1998) que o meristema da raiz possua estabilidade estrutural e funcional, mesmo isolado das plantas, o que justifica que algumas culturas de raízes são mantidas por longo prazo sem qualquer alteração no seu padrão de crescimento (Kerbaudy<sup>b</sup>, 1998).

Semelhante ao resultado apresentado na cultura de segmentos apicais e segmentos nodais foliares e cotiledonares, a presença de BAP na cultura de raízes foi mais efetiva na produção de calos do que a cinetina nas mesmas concentrações, exceto nas suas maiores concentrações (**Tabela 12**). Ainda comparando com as culturas de segmentos nodais, as culturas de raízes apresentaram o mesmo comportamento de formação de calos relacionado à concentração de BAP, revelando maior eficiência do regulador em concentrações menores. Essa similaridade nas respostas morfogênicas das culturas de raízes e segmentos nodais está de acordo com a premissa de que essas culturas apresentam, basicamente, o mesmo comportamento diante do sinergismo auxina/citocinina (Kerbaudy<sup>b</sup>, 1998). Mello *et al.* (2001) observaram a formação de calos em segmentos de raízes de *Curcuma zedoaria* em meio MS suplementado com 13,4 µM de ANA e 2,2 µM de BAP.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos, indicaram que os segmentos caulinares de *Tabebuia heptaphylla*, contendo a gema apical e os nós foliares e cotiledonares, são excelentes fontes de explantes para propagação *in vitro*, apresentando porcentagens de formação de brotos, mesmo na ausência de citocinina exógena e baixa porcentagem de explantes oxidados.

O uso de BAP nas culturas, pode ser considerado mais efetivo na micropropagação que o uso de CIN nas mesmas concentrações. Houve uma tendência do BAP ser mais eficiente na formação de brotos em menores concentrações.

A cultura de raízes não mostrou ser eficiente para a micropropagação ou para produção de calos. A presença de BAP nessa cultura, foi mais efetiva na calogênese quando comparada à presença de CIN.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHONY, J. M.; SENARATNA, T.; DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K. The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* (Ericaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 78, 247-252, 2004.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds. ) – **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v. 1, p.87-132, 1998.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture (Part 1) The Technology**. 2 ed. Edington: Exegetics Limited 574p. 1993.

HIREGOUDAR, L. V.; MURTHY, H. N.; HEMA, B. P.; HAHN, E. J. PAEK, K. Y. Multiple shoot induction and plant regeneration of *Feronia limonia* (L.) Swingle. **Scientia Horticulturae**. n. 98, p. 357-364, 2003.

KERBAUY<sup>a</sup>, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds. ) – **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v. 2, p.519-531, 1998.

KERBAUY<sup>b</sup>, G. B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds. ) – **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v. 2, p.161-181, 1998.

KIM, K. S.; JANG, G.W. Micropropagation of *Drosera peltata*, a tuberous sundew, by shoot tip culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 77, p. 211-214, 2004.

LISOWSKA, K. E WYSOKINSKA, H. In vitro propagation of *Catalpa ovata* G. Don.

**Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** N. 60 p. 171-176, 2000.

LLOYD, G. & McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*. **Int. Plant. Prop. Soc. Proc.** v. 30, p. 421, 1981.

MARUYAMA, E; KINOSHITA, I; ISHII, K; OHBA, K; SAITO, A. Germoplasm conservation of the tropical Forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *jacaranda mimosaeifolia* D. Don., shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25°C. **Plant Cell Report**, 16: 393-396, 1997.

MELLO, M. O.; MELO, M.; APPEZZATO-DA-GLORIA. Histological Analysis of the Callogenesis and Organogenesis from Root Segments of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v. 44, n. 2, p. 197-203, 2001.

MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S. R. B.; SOARES, P. F.; FORTES, G. R. L. Efeito do BAP e TDZ na calogêneses e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.

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

NAGORI, R.; PUROHIT, S. D.; *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae.** n. 99, p. 89-98, 2004.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy.** New York: Oxford University Press. 322p. 1999.

SAINI, R. JAIWAL, P. K. Age, position in mother seedling, orientation, and polaritu of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper ) determines its morphogenic response. **Plant science**, n. 163 p. 101-109, 2002.

SINGH, S. K.; MEGHWAL, P. R.; SHARMA, H. C. SINGH, S.P. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. **Scientia Horticulturae**, 95. 2002. p. 213-221.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

## **EFEITO DO TIPO E DA IDADE DO EXPLANTE E DO NÚMERO DE SUBCULTURAS NA MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Tabebuia heptaphylla* (VELLOZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)**

### **1. INTRODUÇÃO**

As técnicas de cultura *in vitro*, baseadas no princípio da totipotência das células vegetais, ou seja, na potencialidade de uma única célula se diferenciar e regenerar uma planta completa, tem gerado grandes avanços na pesquisa básica, principalmente na fisiologia, bioquímica e genética de plantas, fornecendo ferramentas de ação em áreas práticas como o melhoramento genético vegetal, a farmacologia, a micropropagação e a conservação de germoplasma (George, 1993; Kerbauy, 1998).

Vários fatores podem atuar no processo de morfogênese *in vitro*. Segundo George (1993), esses fatores podem ser divididos em três grupos: o genótipo, as condições ambientais e os fatores do explante.

O genótipo, de acordo com George (1993), é o fator mais significativo na morfogênese *in vitro*. A variabilidade das respostas morfogênicas ocorre não somente entre espécies diferentes, mas também entre genótipos da mesma espécie, inclusive entre sementes da mesma planta matriz, visto que há variações genéticas em sementes zigóticas (Grattapaglia e Machado, 1990). Inúmeros relatos têm confirmado a influência do genótipo na morfogênese *in vitro*. Ibrahim e Debergh (2001) destacam que a frequência de brotações e de regeneração de *Rosa hybrida* é dependente do genótipo e Kantharajah e Golegaonkar (2004) observaram respostas morfogênicas distintas em genótipos diferentes de *Solanum melongena*.

Entre os fatores relacionados às condições ambientais que afetam a cultura *in vitro*, George (1993) cita a composição, o pH e a consistência do meio de cultura, os gases da atmosfera *in vitro*, a temperatura, a intensidade luminosa, o fotoperíodo e a umidade.

De acordo com George (1993), os três principais fatores relacionados ao explante que afetam a morfogênese, são os processos epigenéticos, o tipo de tratamento aplicado à planta-matriz e as condições fisiológicas do explante.

A idade fisiológica do explante afeta a morfogênese. Saini e Jaiwal, (2002) relataram diferenças no comportamento *in vitro* de explantes com idades diferentes. Os autores reportaram que explantes oriundos de plântulas 17 dias resultaram em maior porcentagem de regeneração e maior porcentagem de brotos por explantes, que aqueles oriundos de plântulas com 3 dias. Porém os explantes mais jovens produziram brotos menores que os originados de explantes mais velhos.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Preparação dos meios de culturas e reguladores de crescimento

Nos experimentos deste trabalho foram utilizados meios de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementados com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel e em alguns experimentos específicos, com reguladores de crescimento em diferentes concentrações. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem que ocorreu por 18 minutos a 120<sup>0</sup>C. Os reguladores de crescimento foram dissolvidos em NaOH 0,1M e solubilizados em água destilada.

### 2.2. Condições de cultura

As culturas foram mantidas em sala de crescimento do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do CCA/UFSC, à temperatura controlada de 25 ± 2<sup>0</sup>C e expostas ao fotoperíodo de 16 horas, através de lâmpadas fluorescentes Sylvânia que forneciam 40 µmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>.

### 2.3. Efeito do tipo e da idade do explante e da concentração de BAP na morfogênese *in vitro*.

O estudo do efeito da idade do explante em diferentes concentrações de BAP na morfogênese *in vitro* foi realizado com a utilização de plantas de *Tabebuia heptaphylla*, crescidas *in vitro* por 2 e 8 meses. Segmentos do caule com aproximadamente 1,0 cm, contendo a gema apical, o primeiro nó foliar e o nó cotiledonar foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio (20 x 150 mm), com 7 ml de meio MS, suplementado com BAP nas concentrações de 0; 1,11 e 2,22 µM.

A avaliação, após 70 dias de cultivo, consistiu na determinação da porcentagem de explantes que tiveram seu tecido expandido, na porcentagem de formação de brotos e calos, na porcentagem de explantes oxidados e na determinação da massa fresca total da cultura, da massa fresca dos brotos, da massa fresca dos calos, do número de brotos formados por explante, do comprimento do maior broto e do número de nós originados de cada explante.

Foram utilizados 10 repetições para cada tratamento. Os dados, exceto as porcentagens, foram submetidos à Análise de Variância Multifatorial, com separação das médias pelo teste de Duncan (p <0,05) (Gomez & Gómez, 1984)

#### **2.4. Efeito do número de subculturas na morfogênese *in vitro*.**

A avaliação do efeito do número de subculturas na morfogênese *in vitro* de explantes caulinares de *Tabebuia heptaphylla* foi realizado durante três subculturas consecutivas.

Segmentos caulinares com aproximadamente 1,0 cm, contendo a gema apical ou o primeiro nó foliar, foram excisado de planta *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* e introduzidos em meio de cultura MS, suplementados com 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP.

A avaliação foi realizada, após 70 dias de cultivo a partir de cada repicagem, consistindo na determinação da porcentagem de explantes cujos tecidos sofreram expansão, da porcentagem de formação de brotos e calos, na porcentagem de explantes oxidados e na determinação da massa fresca da cultura, da massa fresca dos brotos, da massa fresca dos calos, do número de brotos por explantes, do comprimento do maior broto e do número de nós originados de cada explante.

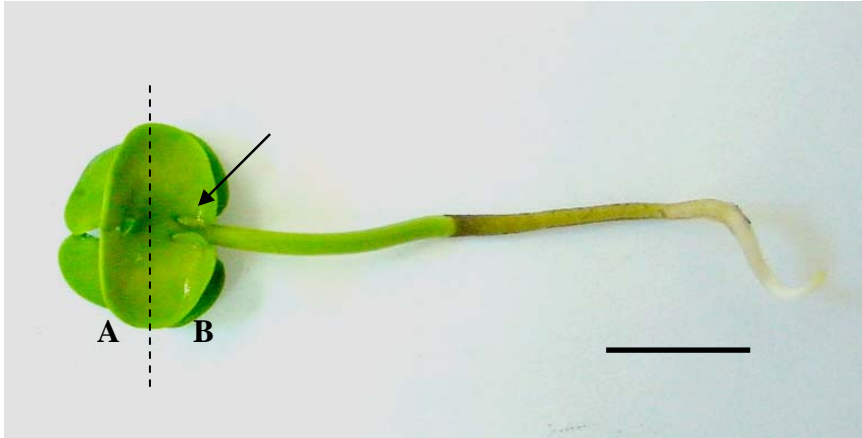
Foram utilizados 4 repetições com 10 explantes cada. Os dados foram submetidos à Análise de Variância Multifatorial, com separação das médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). Os dados referentes a porcentagem foram previamente transformados em  $\sqrt{\%}$  (Gomez & Gómez, 1984).

#### **2.5. Efeito do tipo de explante cotiledonar e da concentração de BAP na morfogênese *in vitro*.**

O estudo do efeito de BAP e do tipo de explante cotiledonar foi realizado com a utilização de cotilédones inteiros e segmentos de cotilédones da região proximal e distal do ponto de inserção no caule (**Figura 17**). Os explantes foram excisados de plantas *in vitro* com 7 dias de idade, e introduzidos meio MS suplementado com 0; 1,11; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP.

A avaliação foi realizada após 70 dias de cultura e consistiu na determinação das porcentagens de explantes cujos tecidos sofreram expansão (em volume), de formação de brotos e calos e de explantes oxidados.

Foram utilizados 4 repetições com 10 explantes para cada tratamento. Os dados foram previamente transformados em  $\sqrt{\%}$  e submetidos à Análise de Variância Multifatorial, com separação das médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Gomez & Gómez, 1984).



**Figura 17.** Plântula de *Tabebuia heptaphylla* crescida *in vitro* com 7 dias de idade. (A) Porção distal do cotilédone. (B) Porção proximal do cotilédone. Tracejado = incisão do cotilédone. Seta = inserção do cotilédone ao eixo da planta. Barra = 1 cm.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efeito do tipo e da idade do explante e da concentração de BAP na morfogênese *in vitro*.

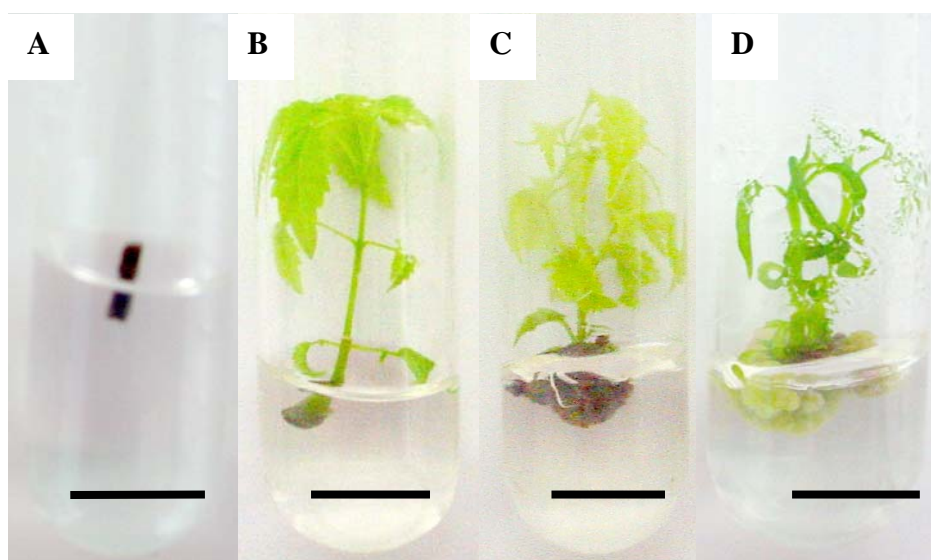
##### 3.1.1. Morfogênese *in vitro* de explante removidos de plantas com 2 meses.

Segmentos nodais caulinares de planta de *Tabebuia heptaphylla in vitro*, com 2 meses de idade apresentaram altas porcentagens de formação de brotos, mesmo em ausência de BAP, formando, nessas condições, brotos em 60% dos nós foliares e em 70% dos nós apicais e cotiledonares (**Tabela 13**). Em meio de cultura suplementado com 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, a frequência de formação de brotos aumentou em relação às cultivadas em meio sem a citocinina, apresentando frequência de formação de brotos de 80% para os nós apicais, e 100% para os nós foliares e cotiledonares. A concentração de BAP no meio de cultura que promoveu maior porcentagem de formação de brotos foi de 2,22  $\mu\text{M}$ , com uma frequência de brotos para nós apicais, foliares e cotiledonares de 100%, 100% e 90% respectivamente (**Tabela 13**). Porém, os brotos formados nesse tratamento, assim como as culturas sem suplemento de BAP foram estatisticamente menores que os brotos formados no tratamento de 1,11  $\mu\text{M}$  (**Tabela 15 e Figura 18**).

Não foi observada a formação de calos, na base dos brotos, em meios de culturas sem BAP. Nesse tratamento, os explantes aumentaram de volume (caule expandido) sem formar calos (**Tabela 13 e Figura 18A**). Apenas os segmentos nodais apicais tiveram explantes oxidados, com 10% de oxidação na ausência de BAP e 20% na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 13**).

**Tabela 13.** Respostas morfogênicas de segmentos apicais, foliares e cotiledonares de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 2 meses de idade, após 70 dias de cultura em meio MS, suplementado com BAP.

Tipo de explante	Formação de brotos		Calos (%)	Calos em Formação (%)	Caule expandido (%)	Explantes oxidados (%)
	BAP ( $\mu\text{M}$ )	(%)				
Segmentos nodais apicais	0	70	0	0	10	10
	1,11	80	80	0	0	20
	2,22	100	60	10	30	0
Segmentos nodais foliares	0	60	0	0	80	0
	1,11	100	60	20	20	0
	2,22	100	60	20	20	0
Segmentos nodais cotiledonares	0	70	0	0	50	0
	1,11	100	60	10	30	0
	2,22	90	40	40	10	0



**Figura 18.** Cultura de segmentos nodais foliares de *Tabebuia heptaphylla*, em meio de cultura MS suplementado com BAP, após 70 dias de cultivo. (A) Explante oxidado sem respostas morfogênica. (B) Broto formado a partir do nó foliar em meio de cultura sem BAP e caule expandido sem formação de calo. (C) Broto e calo formado a partir do nó foliar em meio de cultura suplementado com 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. (D) Broto e Calo formado a partir do nó foliar em meio de cultura com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP. Barra = 15 mm.

A análise de variância multifatorial não indicou interação significativa para os parâmetros avaliados (massa fresca total, dos brotos e dos calos, número e comprimento do broto e número de nós) entre fatores: tipo de explante (nó foliar, nó cotiledonar e nó apical) e concentração de BAP (0; 1,11 e 2,22  $\mu\text{M}$ ).

Apenas na ausência de BAP houve diferenças entre os tipos de explante com relação à massa fresca total, sendo o maior valor obtido para nós cotiledonares (129,20 mg). Para todos os tipos de explantes a presença de BAP promoveu o aumento da massa fresca total em relação ao controle (**Tabela 14**).

Em relação à massa fresca dos brotos, observou-se igualmente, que apenas houve diferenças entre os tipos de explante na ausência de BAP e que o nó cotiledonar apresentou valor superior (155,6 mg) aos nós apical (7,29 mg) e foliar (66,8 mg). A presença de BAP promoveu o aumento da massa fresca dos brotos apenas no nó apical (**Tabela 14**).

Em termos de massa fresca dos calos, houve diferença entre os tipos de explante apenas na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, sendo o valor obtido para o nó apical superior (492 mg) ao nó cotiledonar (156,29 mg). Não houve diferenças entre as massas frescas dos calos produzidos a 1,11  $\mu\text{M}$  ou a 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, para nenhum dos tipos de explantes inoculados (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Massa fresca total, dos brotos e dos calos, após 70 dias de cultura em meio MS suplementado com BAP, originadas de segmentos nodais de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com aproximadamente 2 meses de idade. Médias de 10 repetições.

Parâmetros	Tipo de Explante	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )			Média
		0	1,11	2,22	
<b>Massa Fresca Total (mg)*</b>	Nó Apical	24,67Aa	561,90Ab	436,90Ab	340,97A
	Nó Foliar	66,80ABa	431,40Ab	510,60Ab	336,27A
	Nó Cotiledonar	129,20Ba	384,30Ab	387,30Ab	300,27A
	<b>Média</b>	73,56a	444,93b	459,01b	
<b>Massa Fresca dos ramos (mg)*</b>	Nó Apical	7,29Aa	151,13Ab	146,40Ab	101,60A
	Nó Foliar	57,50Aa	160,20Aa	177,10Aa	131,60AB
	Nó Cotiledonar	155,60Ba	222,30Aa	207,90Aa	195,27B
	<b>Média</b>	73,46a	177,13b	177,88b	
<b>Massa Fresca do calo (mg)*</b>	Nó Apical	**	492,00Aa	339,43Aa	415,71A
	Nó Foliar	**	282,88ABa	383,75Aa	333,31A
	Nó Cotiledonar	**	156,29Ba	175,33Aa	165,81B
	<b>Média</b>	**	310,39a	299,50a	

\*Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% e pelo teste t de student ao nível de 5%.

\*\*Não houve formação de calos em ausência de BAP.

Com relação ao número de brotos, observa-se pela **Tabela 15**, que tanto na ausência como na presença de BAP, houve diferença entre os explantes. Na ausência de BAP, o nó cotiledonar apresentou maior número de brotos do que o nó apical. Na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP os nós foliar e cotiledonar foram superiores ao apical, enquanto que na presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, o nó cotiledonar apresentou o maior número de brotos em relação ao nó apical e foliar. Para o nó apical não houve diferenças entre o número de brotos formados em meios de cultura controle ou em meios de cultura com BAP. Entretanto, para os nós foliar e cotiledonar, a presença de BAP a 1,11  $\mu\text{M}$  e 2,22  $\mu\text{M}$ , promoveu de forma similar, a formação de brotos.

Quanto ao comprimento broto de cada explante, houve diferenças entre os tipos de explantes apenas na ausência de BAP, sendo que o nó apical apresentou comprimento inferior (3,71 mm) ao nó cotiledonar (16,86 mm). O regulador de crescimento não influenciou no comprimento do broto, exceto para o nó apical que alcançou maior comprimento do broto na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP (21,13 mm) (**Tabela 15**).

Somente o nó apical apresentou diferenças quanto ao número de nós na ausência BAP. O número de nós não apresentou diferenças entre os tipos de explantes na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, o que não ocorreu na ausência e na presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, onde as plantas provenientes do nó apical apresentaram menor número de nós que o cotiledonar (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** Número de brotos, comprimento do maior broto (mm) e número de nós, originados de segmentos nodais apicais, foliares e cotiledonares de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 2 meses de idade, após 70 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP. Médias de 10 repetições.

Parâmetros	Tipo de Explante	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )			Média
		0	1,11	2,22	
Número de brotos por explante*	Nó Apical	1,29Aa	1,38Aa	2,30Aa	1,65A
	Nó Foliar	1,50ABa	3,30Bb	3,20ABb	2,67B
	Nó Cotiledonar	2,00Ba	3,70Bb	4,11Bb	3,27B
	Média	1,60a	2,79b	3,20b	
Comprimento do maior broto* (mm)	Nó Apical	3,71Aa	21,13Ab	12,10Aa	12,31A
	Nó Foliar	10,00ABa	16,20Aa	7,10Aa	11,10A
	Nó Cotiledonar	16,86Ba	16,00Aa	12,44Aa	15,10A
	Média	10,19a	17,76b	10,55a	
Número de nós <sup>a</sup>	Nó Apical	1,43Aa	3,75Ab	4,50Ab	3,23A
	Nó Foliar	3,00ABa	5,70Aa	5,60ABa	4,77A
	Nó Cotiledonar	4,83Ba	6,20Aa	9,22Ba	6,75B
	Média	3,09a	5,22b	6,44b	

\*Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan ao nível de 5%.

### 3.1.2. Morfogênese *in vitro* de explantes removidos de plantas com 8 meses

Explantes com 8 meses, após 70 dias em meio de cultura na ausência ou na presença de BAP, apresentaram altas porcentagens de oxidação, tanto para nós foliares (40-50%), como para nós cotiledonares (40-70%). Contudo, a porcentagem de oxidação para nós apicais variou de 0 a 30%. Houve maior porcentagem de oxidação na ausência de BAP para todos os tipos de explante (**Tabela 16**).



A maior porcentagem de formação de brotos foi obtida na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. As porcentagens de explantes que obtiveram brotos foram de 70-100% para nós apicais, de 50-60%, para nós foliares e de 30-60%, para nós cotiledonares.

Com relação à formação de calos, verificou-se que a maior porcentagem foi obtida na presença de BAP a 1,11  $\mu\text{M}$ , exceto para o nó cotiledonar que apresentou maior porcentagem na presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 16**).

**Tabela 16.** Respostas morfogênicas de segmentos nodais apicais, foliares e cotiledonares de *Tabebuia heptaphylla* com 8 meses de idade, após 70 dias de cultura *in vitro* em meio MS, suplementado com BAP.

Tipo de explante	BAP ( $\mu\text{M}$ )	Formação de brotos (%)	Calos (%)	Calos em Formação (%)	Caule expandido (%)	Explantes oxidados (%)
<b>Segmentos nodais apicais</b>	0	70	10	0	60	30
	1,11	100	100	0	0	0
	2,22	90	90	0	0	10
<b>Segmentos nodais foliares</b>	0	50	30	0	20	50
	1,11	60	30	0	30	40
	2,22	50	10	0	40	50
<b>Segmentos nodais cotiledonares</b>	0	30	30	0	0	70
	1,11	40	0	20	20	60
	2,22	60	50	0	10	40

A análise de variância multifatorial não indicou interação significativa entre o tipo de explante e a concentração de BAP, para nenhum dos parâmetros analisados (**Tabela 17 e 18**).

Somente na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, houve diferença na massa fresca total entre tipos de explante. Para os nós apicais e foliares a presença de BAP aumentou o valor da massa fresca total. Na presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP a massa fresca total foi superior à obtida sem BAP, para esses dois tipos de explantes. O mesmo não ocorreu para os nós cotiledonares, que não sofreram influência do regulador de crescimento na massa fresca total (**Tabela 17**).

O tipo de explante não teve efeito sobre a massa fresca dos brotos. Somente para o nó cotiledonar não houve diferença na ausência de BAP. Já para os demais tipos de explantes a presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP resultou em massa fresca dos brotos superior as obtidas na ausência de BAP (**Tabela 17**).

A massa fresca dos calos não foi afetada pelo tipo de explante. Somente o nó foliar revelou valores diferentes na ausência de BAP, apresentando maior massa fresca dos calos na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP (166,67 mg), em relação à massa fresca dos calos na ausência de BAP (39,33 mg) (**Tabela 17**).

**Tabela 17.** Massa fresca total, dos brotos e dos calos, após 70 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP, originadas de segmentos nodais de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com aproximadamente 8 meses de idade. Médias de 10 repetições.

Parâmetros	Tipo de Explante	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )			Média
		0	0,25	0,5	
Massa fresca total (mg)*	Nó Apical	73,71Aa	515,5Ab	469,00Ab	352,74A
	Nó Foliar	132,60Aa	309,00ABab	524,00Ab	321,87A
	Nó Cotiledonar	150,33Aa	237,75Ba	493,83Aa	293,97A
	<b>Média</b>	118,88a	354,08b	495,61b	
Massa Fresca dos Ramos (mg)*	Nó Apical	52,14Aa	199,40Ab	187,11Ab	146,22A
	Nó Foliar	66,80Aa	171,67Aab	307,80Ab	182,09A
	Nó Cotiledonar	85,00Aa	104,00Aa	183,00Aa	124,00A
	<b>Média</b>	67,98a	158,36b	225,97b	
Massa Fresca do calo (mg)*	Nó Apical	**	316,10Aa	281,89Aa	234,28A
	Nó Foliar	39,33Aa	166,67Ab	**	132,98A
	Nó Cotiledonar	56,33Aa	**	306,20Aa	224,03A
	<b>Média</b>	66,42a	267,81a	257,05a	

\*Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% e pelo teste t de Student ao nível de 5%.

Quanto ao número de brotos, não houve diferenças significativas somente na presença de BAP a 1,11  $\mu\text{M}$ . Na ausência de BAP, o nó apical apresentou menor número de brotos (1) que os nos foliares (1,8) e cotiledonares (2). Já na presença de BAP a 2,22  $\mu\text{M}$  o nó apical foi inferior ao nó foliar no número de brotos, mas não diferiu do nó cotiledonar (**Tabela 18**).

Em relação ao comprimento dos brotos, não houve diferença entre os tratamentos, tanto para os tipos de explantes, como para a ausência ou presença de 1,11 e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP.

O número de nós de cada explante não foi alterado pelo tipo de explante. Somente o nó apical apresentou diferença na ausência de BAP, revelando menor número de nós (2,29) em relação aos que foram mantidos na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP (4,10) (**Tabela 18**).

**Tabela 18.** Número de brotos por explante, comprimento (mm) do maior broto e número nós, originados de segmentos nodais apicais, foliares e cotiledonares de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com aproximadamente 8 meses de idade, após 70 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP.

Número de brotos*	Tipo de Explante	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )			Média
		0	1,11	2,22	
	Nó Apical	1,00Aa	2,30Ab	2,33Ab	1,88A
	Nó Foliar	1,80Ba	3,83Aa	4,60Ba	3,41B
	Nó Cotiledonar	2,00Ba	2,25Aa	4,00ABb	2,75AB
	<b>Média</b>	1,60a	2,79b	3,64b	
Comprimento do broto (mm)*	Nó Apical	12,43Aa	13,10Aa	11,78Aa	12,44A
	Nó Foliar	14,40Aa	8,67Aa	13,60Aa	12,22A
	Nó Cotiledonar	15,00Aa	9,50Aa	6,67Aa	10,39A
	<b>Média</b>	13,94a	10,42a	10,68a	
Número de nós*	Nó Apical	2,29Aa	4,10Ab	3,78Aab	3,39A
	Nó Foliar	4,40Aa	5,00Aa	7,40Aa	5,60B
	Nó Cotiledonar	4,33Aa	3,00Aa	5,67Aa	4,33AB
	<b>Média</b>	3,67a	4,03a	5,61b	

\*Médias de 10 repetições por tratamento. Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan ao nível de 5%.

### 3.1.3. Morfogênese *in vitro* de explantes removidos de plantas com 2 e 8 meses

#### 3.1.3.a. Segmentos contendo a gema apical.

Apenas para o comprimento dos brotos, a análise de variância multifatorial indicou interação significativa entre a idade do explante e a concentração de BAP (**Apêndice E**). Em nenhum tratamento, houve diferença entre os segmentos apicais com 2 meses e 8 meses. Explantes com 2 meses, na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, apresentaram maior comprimento de brotos (**Tabela 19**).

A massa fresca total, dos brotos e dos calos, e o número de nós não apresentaram diferenças entre as idades do explante em nenhum tratamento. O número de brotos, entretanto, apresentou diferenças significativas entre explantes com 2 e 8 meses na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. Segmentos apicais, com 2 meses na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram menor número de brotos que os explantes com 8 meses de idade (**Tabela 20**).

A ausência de BAP resultou em menor massa fresca total, dos brotos e dos calos e menor número de nós em relação às culturas expostas a 1,11  $\mu\text{M}$  e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP para explantes de ambas as idades. Comportamento semelhante foi observado para o número de brotos, com exceção de explante com 2 meses de idade, apresentando número de brotos sem diferença significativa na ausência ou na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 20**).

**Tabela 19.** Efeito da idade do explante e da concentração de BAP no comprimento do broto originados da cultura *in vitro* de segmentos nodais apicais, de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 2 e 8 meses de idade. Média de 10 repetições.

Idade da planta (meses)	BAP ( $\mu\text{M}$ )	Comprimento do broto (mm)*
2	0	3,71 a
	1,11	21,13 c
	2,22	12,10 ab
8	0	12,43 ab
	1,11	13,10 bc
	2,22	11,78 ab

\*Valores da mesma coluna, seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

**Tabela 20.** Morfogênese de segmentos nodais apicais de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 2 e 8 meses de idade, após 70 dias de cultivo, em meio MS suplementado com BAP.

Parâmetros	Idade do explante	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )			Média
		0	1,1	2,22	
Massa fresca total das culturas (mg)*	2 meses	24,67Aa	561,33Ab	436,90Ab	340,97A
	8 meses	73,71Aa	515,50Ab	469,00Ab	352,74A
	<b>Média</b>	49,19a	538,42b	452,95b	
Massa Fresca dos brotos (mg)*	2 meses	7,29Aa	151,13Ab	146,40Ab	101,60A
	8 meses	52,14Aa	199,40Ab	187,11Ab	146,22A
	<b>Média</b>	29,71a	175,26b	166,76b	
Massa Fresca do calo (mg)*	2 meses	**	492,00Aa	339,43Aa	415,71A
	8 meses	**	316,10Aa	281,89Aa	298,99A
	<b>Média</b>	**	404,05a	310,66a	
Número de brotos por explantes*	2 meses	1,29Aa	1,38Aa	2,30Ab	1,65A
	8 meses	1,00Aa	2,30Bb	2,33Ab	1,88A
	<b>Média</b>	1,14a	1,84b	2,32b	
Número de nós*	2 meses	1,43Aa	3,75Ab	4,50Ab	3,23A
	8 meses	2,29Aa	4,10Ab	3,78Aab	3,39A
	<b>Média</b>	1,86a	3,93b	4,14b	

\*Médias de 10 repetições. Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste t e pelo teste Duncan respectivamente.

\*\* Não houve a formação de calos a partir do nó apical em ausência de BAP

### 3.1.3.b. Segmentos contendo o nó foliar.

Para todos os parâmetros avaliados, massa fresca total, massa fresca dos brotos, massa fresca dos calos, número de brotos, comprimento do broto e número de nós, a análise de variância multifatorial não indicou interação entre a idade do explante e a concentração de BAP. Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas entre explantes com 2 e 8 meses para nenhum dos parâmetros e tratamentos (**Tabela 21**).

O uso do BAP no meio de cultura induziu um aumento de massa fresca total, entretanto, explantes com 8 meses de idade em ausência de BAP diferiu apenas das culturas com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 21**).

A massa fresca dos brotos em explantes com 2 meses não diferiu na ausência de BAP em relação às culturas com BAP. Porém houve diferença significativa nos explantes para os 8 meses entre as culturas na ausência de BAP e na presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 21**).

As massas frescas dos calos originados a partir de cultura de segmentos foliares com 2 meses, expostas a 1,11 e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP não diferiram entre si. Calos de explantes com 8 meses na presença de BAP, apresentaram massa fresca superior em relação aos calos na ausência de BAP.

O número de brotos não variou na ausência ou presença de BAP para explantes com 8 meses. Porém, para explantes com 2 meses de idade, o BAP provocou aumento no número de brotos, demonstrando que explantes mais jovens, reage melhor ao BAP para a multiplicação (**Tabela 21**).

O comprimento do broto e o número de nós não diferiram estatisticamente entre a ausência e a presença de 1,11 e 2,22 $\mu\text{M}$  (**Tabela 21**).

**Tabela 21.** Morfogênese de segmentos nodais foliares de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 2 e 8 meses de idade, após 70 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP.

Parâmetros	Idade do explante	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )			Média
		0	1,11	2,22	
Massa fresca total das culturas (mg)*	2 meses	66,80Aa	431,40Ab	510,60Ab	336,27A
	8meses	132,60Aa	309,00Aab	524,00Ab	321,87A
	<b>Média</b>	99,70a	370,20b	517,30b	
Massa Fresca dos brotos (mg)*	2 meses	57,50Aa	160,20Aa	177,10Aa	131,60A
	8meses	66,80Aa	171,67Aab	307,80Ab	182,09A
	<b>Média</b>	62,15a	165,93ab	242,45b	
Massa Fresca do calo (mg)*	2 meses	**	282,88Aa	383,75a	333,31a
	8meses	39,33a	166,67Ab	**	103,00b
	<b>Média</b>	39,33a	251,18ab	383,75b	
Número de brotações*	2 meses	1,50Aa	3,30Ab	3,20Ab	2,67A
	8meses	1,80Aa	3,83Aa	4,60Aa	3,41A
	<b>Média</b>	1,65a	3,57b	3,90b	
Comprimento do maior broto (mm)*	2 meses	10,00Aa	16,20Aa	7,10Aa	11,10A
	8meses	14,40Aa	8,67Aa	13,60Aa	12,22A
	<b>Média</b>	12,20a	12,43a	10,35a	
Número de Nós*	2 meses	3,00Aa	5,70Aa	5,60Aa	4,77A
	8meses	4,48Aa	5,00Aa	7,40Aa	5,60A
	<b>Média</b>	3,70a	5,35ab	6,50b	

\*Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste t e pelo teste Duncan respectivamente.

\*\*Não houve formação de calos.

### **3.1.3.c. Segmentos contendo nó cotiledonar.**

Como os segmentos nodais foliares, os segmentos contendo os nós cotiledonares não apresentaram interação significativa entre a idade do explante e a concentração de BAP, para todos os parâmetros avaliados pela Análise de Variância Multifatorial (massa fresca total, dos brotos, e dos calos, número de brotos, comprimento do broto e número de nós). Também não foi verificada diferença estatística entre explantes com 2 e 8 meses, para todos os parâmetros (**Tabela 22**).

A presença de BAP promoveu maior massa fresca total em explante com 2 meses de idade, o que não ocorreu em explantes com 8 meses, que não apresentaram diferenças entre a ausência e a presença de 1,11  $\mu\text{M}$  e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 22**).

A presença de BAP não afetou a massa fresca dos brotos, o comprimento do maior broto e o número de nós, tanto para explantes com 2 meses, como para explantes com 8 meses. Já em relação ao número de brotos, as culturas em ausência de BAP apresentaram menor valor que as culturas expostas ao BAP. Para explantes com 8 meses de idade, a presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP promoveu maior número de brotos que os demais tratamentos (**Tabela 22**).

**Tabela 22.** Morfogênese de segmentos nodais cotiledonares de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 2 e 8 meses de idade, após 70 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP. Médias de 10 repetições.

Parâmetros	Idade do explante	Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )			Média
		0	1,11	2,22	
Massa fresca total (mg)*	2 meses	129,20Aa	384,30Ab	387,30Ab	300,27A
	8 meses	150,33Aa	237,75Aa	493,83Aa	293,97A
	<b>Média</b>	139,77a	331,03b	440,57b	
Massa Fresca dos Ramos (mg)*	2 meses	155,60Aa	222,30Aa	207,90Aa	195,27A
	8 meses	85,00Aa	104,00Aa	183,00Aa	124,00A
	<b>Média</b>	120,30a	163,15a	195,45a	
Massa Fresca do calo (mg)*	2 meses	**	156,29a	175,33Aa	167,00A
	8 meses	56,33a	**	306,20Aa	212,50A
	<b>Média</b>	56,33a	156,29a	222,07a	
Número de brotos*	2 meses	2,00Aa	3,70Ab	4,11Ab	3,27A
	8 meses	2,00Aa	2,25Aa	4,00Ab	2,75A
	<b>Média</b>	2,00a	2,98b	4,06c	
Comprimento do maior broto (mm)*	2 meses	16,86Aa	16,00Aa	12,44Aa	15,10A
	8 meses	15,00Aa	9,50Aa	6,67Aa	10,39A
	<b>Média</b>	15,93a	12,75a	9,56a	
Número de nós*	2 meses	4,83Aa	6,20Aa	9,22Aa	6,75A
	8 meses	4,33Aa	3,00Aa	5,67Aa	4,33A
	<b>Média</b>	4,58a	4,60a	7,44a	

\*Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste t e pelo teste Duncan respectivamente.

\*\* Não houve formação de calos.

### 3.2. Efeito do tipo de explante e do número de subculturas na morfogênese *in vitro*.

Em culturas de segmentos caulinares contendo os nós apicais e foliares, foi observada a expansão do caule, a formação de calos e brotos. Houve também a oxidação de alguns explantes (2,5-30%). Esses comportamentos morfogênicos foram afetados pela interação entre o número de subculturas e o tipo de explante (**Tabela 23 e Apêndice F**).

Na terceira subcultura, não houve expansão do caule, sendo que esse ocorreu em maior frequência nos nós foliares da primeira subcultura (22,5%). O nó apical da primeira subcultura e os nós apical e foliar da segunda subcultura não diferiram entre si na porcentagem de expansão do caule (**Tabela 23**).



A maior porcentagem de formação de calos foi obtida em nó apical da primeira subcultura (97,5%), seguido pelo nó foliar da primeira (62,5%) e segunda subcultura (67,5%). O nó foliar da terceira subcultura promoveu a menor formação de calos (**Tabela 23**).

Todos os explantes da primeira subcultura apresentaram alguma alteração morfogênica. O nó apical da terceira subcultura apresentou a maior porcentagem de explantes sem respostas morfogênicas, seguida pelo nó foliar da terceira subcultura e o nó apical da segunda subcultura (**Tabela 23**).

**Tabela 23** . Respostas morfogênicas obtidas a partir da cultura de explantes de segmentos caulinares de *Tabebuia heptaphylla*, contendo os nós apicais ou foliares, durante a primeira, segunda e terceira subcultura. Média de 4 repetições com 10 explantes cada.

Número de subcultura*	Explante	Expansão do explante (%)**	Calos (%)**	Formação de brotos (%)**	Oxidação (%)**	Sem resposta (%)**
1	Apical	5,00 ab	92,50 d	97,50 d	2,50 a	0 a
	Foliar	22,50 c	62,50 c	92,50 c	7,50 b	0 a
2	Apical	7,50 b	37,50 ab	50,00 a	30,00 d	17,5 c
	Foliar	7,50 b	67,50 c	70,00 b	17,50 cd	10,00 b
3	Apical	0 a	47,50 b	37,50 a	20,00 cd	27,50 d
	Foliar	0 a	27,50 a	67,50 b	10,00 bc	20,00 c

\* As repicagens foram realizadas a cada 60 dias.

\*\*Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

A Análise de Variância Multifatorial indicou para os parâmetros massa fresca da cultura, massa fresca dos calos, número de brotos por explantes e comprimento do maior broto, uma interação significativa entre o número de subcultura e o tipo de explante (**Apêndice G**).

Em relação à massa fresca total, o menor valor foi obtido na terceira subcultura, tanto para nó apical como para o nó foliar, que apresentaram massa fresca estatisticamente semelhante ao nó apical da segunda subcultura. O nó apical da primeira subcultura apresentou a maior massa fresca (711,67 mg), seguida pelo nó foliar da primeira e da segunda subcultura que não diferiram entre si (**Tabela 24**).

Como no caso da massa fresca total, a menor massa fresca dos calos foi obtida na terceira subcultura para os dois tipos de explantes, porém esses valores não diferiram do nó apical da segunda subcultura e do nó foliar da primeira subcultura. O nó apical da primeira subcultura apresentou a maior massa fresca dos calos (581 mg) (**Tabela 24**).

Para o nó apical, não houve diferenças estatísticas no número de brotos entre as três subculturas, não diferindo também do nó foliar da terceira subcultura. O maior número de brotos foi obtido com os nós foliares da primeira e da segunda subcultura (**Tabela 24**).

O maior crescimento do broto (comprimento) foi promovido pelo nó apical da primeira repicagem. Os valores obtidos da segunda e terceira repicagem, nos dois tipos de explantes, não diferiram entre si (**Tabela 24**).

**Tabela 24.** Massa fresca (mg) total e dos calos, número de brotos por explantes e comprimento do maior broto obtido a partir da cultura de explantes de segmentos caulinares de *Tabebuia heptaphylla*, contendo os nós apicais ou foliares, da primeira, segunda e terceira subcultura. Médias de 4 repetições com 10 explantes cada.

Número de subculturas*	Explante	Massa Fresca total (mg)**	Massa Fresca dos Calos (mg)**	Número de brotos**	Comprimento do broto**
1	Apical	711,67 c	581,00 c	1,42 a	25,50 c
	Foliar	384,08 b	259,92 ab	3,08 b	13,17 b
2	Apical	241,17 ab	224,67 ab	1,00 a	9,08 ab
	Foliar	380,75 b	313,25 b	2,58 b	6,92 ab
3	Apical	67,00 a	55,33 a	1,00 a	5,55 a
	Foliar	108,67 a	81,92 a	1,58 a	8,17 ab

\* As repicagens foram realizadas a cada 60 dias.

\*\*Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Para a massa fresca dos brotos e o número de nós não houve interação entre o número de subculturas e o tipo de explante (**Tabela 25**).

Em nenhuma subcultura foi observada diferença na massa fresca dos brotos, entre os tipos de explantes. Para os nós apicais e foliares, a primeira subcultura

apresentou massa fresca dos brotos estatisticamente superior a segunda subcultura, que por sua vez foi superior a terceira (**Tabela 25**).

Em relação ao número de nós, o valor obtido pelo nó foliar foi significativamente superior ao nó apical em todas as repicagens. Semelhante ao comportamento apresentado pela massa fresca dos brotos, a primeira subcultura apresentou número de nós estatisticamente superior a segunda subcultura que foi superior a terceira (**Tabela 25**).

**Tabela 25.** Efeito do número de subculturas na massa fresca dos brotos e no número de nós dos brotos obtidos a partir da cultura de segmentos caulinares contendo os nós apicais ou foliares de *Tabebuia heptaphylla*. Médias de 4 repetições com 10 explantes cada.

Parâmetros	Explante	Número de subculturas*			Média
		Primeira	Segunda	Terceira	
Massa fresca dos brotos (mg)**	Apical	131,42Ac	72,67Ab	11,67Aa	71,92A
	Foliar	123,83Ac	67,50Ab	26,75Aa	72,69A
	Média	127,63c	70,08b	19,21a	
Número de Nós**	Apical	3,75Ac	2,17Ab	1,18Aa	2,37A
	Foliar	5,33Bc	3,42Bb	2,50Ba	3,75B
	Média	4,54c	2,79b	1,87a	

\* As repicagens foram realizadas a cada 60 dias.

\*\*Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

### 3.3. Efeito do tipo de explante cotiledonar e da concentração de BAP na morfogênese *in vitro*.

Foi observado em culturas de segmentos cotiledonares, que a porcentagem de explantes que sofreram expansão dos tecidos foi afetada pela interação entre o tipo de explante cotiledonar e a concentração de BAP (**Apêndice H**). A menor porcentagem de explantes expandidos foi verificada na porção proximal do cotilédone, na ausência de BAP e pela porção distal, na ausência ou na presença de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP. Cotilédones inteiros apresentaram maior porcentagem de explantes expandidos em relação às porções proximal e distal (**Tabela 26**).

**Tabela 26.** Efeito de BAP em diferentes concentrações, após 60 dias, na expansão dos tecidos (em volume) de cotilédones inteiros ou segmentos de cotilédones excisados de plantas *in vitro* com 2 meses de idade. Médias de 4 repetições com 10 explantes cada.

<b>Tipo de explante</b>	<b>BAP (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Explantes que sofreram expansão (%)*</b>
<b>Cotilédone inteiro</b>	0	72,50 e
	1,11	72,50 e
	2,22	62,50 de
	4,44	77,50 e
<b>Porção cotiledonar proximal ao eixo embrionário</b>	0	20,00 a
	1,11	42,50 bc
	2,22	50,00 cd
	4,44	40,00 bc
<b>Porção cotiledonar distal ao eixo embrionário</b>	0	30,00 ab
	1,11	52,50 cd
	2,22	50,00 cd
	4,44	30,00 ab

\*Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

A análise de variância multifatorial não indicou interação entre o tipo de explante e a concentração de BAP para porcentagem de formação de calos, de brotos e de oxidação dos explantes. Apenas na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP houve diferenças entre os tipos de explante na porcentagem de formação de calos. Nessas condições, cotilédones inteiros promoveram maior formação de calos que quando segmentados (**Tabela 27**).

Em todos os tipos de explantes, a presença de BAP favoreceu a formação de calos, apresentando valores superiores aos obtidos na ausência deste regulador. Para os cotilédones inteiros não houve diferenças entre as concentrações de BAP. Tanto para a porção proximal quanto distal, a presença de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP promoveu maior formação de calos que a 1,11  $\mu\text{M}$ , porém, esta não diferiu das culturas com 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (**Tabela 27**).

Quanto à porcentagem de formação de brotos, a porção distal não apresentou formação de brotos. Não houve diferenças entre os tipos de explantes para culturas na ausência e na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP. Na presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, o cotilédone inteiro apresentou porcentagem de formação de brotos estatisticamente

superior aos demais explantes que não diferiram entre si. Já na presença de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, o cotilédone inteiro não diferiu da porção proximal, e ambos apresentaram valores superiores a porção distal (Tabela 27). Para o cotilédone inteiro houve diferenças na porcentagem de formação de brotos apenas entre as culturas na presença de 1,11 e 2,22  $\mu\text{M}$ , sendo que essa última concentração apresentou porcentagem de formação de brotos superior. As porções proximal e distal não foram afetadas pela ausência ou presença de BAP em qualquer concentração (Tabela 27).

Não houve diferenças significativas entre os tipos de explantes na oxidação, em culturas na presença de 1,11 e 4,44  $\mu\text{M}$ . Cotilédones inteiros na ausência de BAP apresentaram porcentagem de oxidação inferior as porções proximal e distal, sendo que a porção proximal foi estatisticamente inferior a porção distal. Na presença de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP, a porção proximal não diferiu da porção distal e do cotilédone inteiro, porém este último apresentou valor inferior em relação a porção distal. Em comparação com o controle, a presença de BAP em qualquer concentração não produziu diferenças na oxidação dos explantes, exceto na porção distal, onde a oxidação foi elevada no controle na presença de 1,11 e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP (Tabela 27).

**Tabela 27.** Efeito de BAP em diferentes concentrações, após 60 dias, na formação de calos e brotos e na porcentagem de oxidação de cotilédones inteiros ou segmentos de cotilédones excisados de plantas *in vitro* com 2 meses de idade. Médias de 4 repetições de 10 explantes cada.

Parâmetros	Tipo de Explante	BAP ( $\mu\text{M}$ )				Média
		controle	1,11	2,22	4,44	
<b>Formação de Calos*</b> (%)	Cotilédone inteiro	4,61Aa	43,56Bb	47,89Ab	50,77Ab	36,71A
	Porção proximal	11,25Aa	37,73Ab	42,12Abc	52,28Ac	35,84A
	Porção distal	0Aa	34,72Ab	47,89Ac	46,66Ac	32,32A
	<b>Média</b>	5,29a	38,67b	45,96c	49,90c	
<b>Formação de brotos*</b> (%)	Cotilédone inteiro	13,83Aab	6,64Aa	24,53Bb	20,47Bab	16,38C
	Porção proximal	11,25Aa	9,22Aa	4,61Aa	13,83Ba	9,73B
	Porção distal	0Aa	0Aa	0Aa	0Aa	0A
	<b>Média</b>	8,36a	5,29a	9,71a	11,43a	
<b>Oxidação de explante*</b>	Cotilédone inteiro	65,47Aa	73,55Aa	63,44Aa	61,77Aa	66,06A
	Porção proximal	76,17Ba	77,09Aa	74,14ABa	63,44Aa	72,71A
	Porção distal	90,00Cb	90,00Ab	85,39Bb	63,59Aa	82,24B
	<b>Média</b>	77,21b	80,21b	74,32b	62,94a	

\*Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Efeito do tipo e da idade do explante e da concentração de BAP na morfogênese *in vitro*.

A oxidação fenólica, considerada um dos principais problemas enfrentados na cultura *in vitro*, é dependente do tipo de explante utilizado. Geralmente explantes jovens oxidam menos que os velhos (Anthony *et al.*, 2004; Bohus, *et al.*, 2005). Além disso, a idade do explante pode afetar a capacidade de rebrotamento (George, 1993). Saini e Jaiwal (2002) relatam que a via morfogênica de regeneração de brotos adventícios em segmentos terminais de epicótilo de *Vigna mungo* é determinada pela idade do explante.

Baseados nessas informações, foram realizados experimentos com explantes excisados de plantas com 2 e 8 meses. Os resultados apontaram uma tendência de maior formação de calos e brotos em culturas de segmentos nodais foliares e cotiledonares advindos de plantas mais novas (**Tabela 13 e 16**). Para as culturas de segmentos apicais os resultados não indicaram influência da idade do explante na formação de brotos e na indução de calos.

De acordo com os dados obtidos (**Tabela 13 e 16**), a idade do explante, aparentemente, afetou a porcentagem de oxidação e o potencial morfogênético dos mesmos, apontando uma tendência de aumento da oxidação e diminuição do potencial morfogênético com o aumento da idade, o que era esperado devido às premissas levantadas por George *et al.* (1993) e Saini e Jaiwal (2002) de que a idade do explante conduz às respostas morfogênicas. Apenas para as culturas de segmentos apicais as diferenças de porcentagens de explantes oxidados não foram evidenciadas.

As culturas contendo as gemas apicais, não apontaram diferenças nas respostas morfogênicas entre as idades para todos os parâmetros avaliados, exceto para o número de brotos (**Tabela 19 e 20**). Esse comportamento, talvez, se deva ao fato que os segmentos apicais possuem meristemas primários, indeterminados no seu desenvolvimento, conservando a sua juvenilidade (Taiz e Zeiger, 2004).

Em relação à utilização de BAP em segmentos apicais, os resultados indicaram que houve interação entre a idade do explante e a concentração da citocinina para o comprimento do broto. Esse parâmetro porém, reflete apenas a influência do BAP no desenvolvimento do broto já formado e não na capacidade de

formação de brotos do explante . Para os parâmetros diretamente relacionados ao comportamento morfogênético do explante como a massa fresca das culturas, formação de brotos e calos e o número de brotos por explantes, não houve influência da idade do explante nos resultados, exceto no número de culturas na presença de 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP, que apresentou maior número de brotos em explantes mais velhos (**Tabela 19 e 20**). Esse resultado, contradiz a premissa que a capacidade dos explantes em produzir brotos decresce com a idade (George *et al.*, 1993; Saini e Jaiwal, 2002). Neste caso, a adição dessa concentração de BAP, provavelmente ajustou o balanço hormonal endógeno do explante com 8 meses favorecendo a brotação (George, 1993; Taiz e Zeiger, 2004).

Para as culturas de segmentos nodais foliares e cotiledonares em diferentes concentrações de BAP, não houve interação entre os fatores: idade do explante e concentração de citocinina para nenhum dos parâmetros avaliados. Além disso, a idade do explante não afetou as respostas morfogênicas em nenhuma das concentrações de BAP utilizadas (**Tabela 21 e 22**).

Esses dados revelaram que para culturas de segmentos nodais foliares e cotiledonares em diferentes concentrações de BAP, a idade dos explantes afetou a porcentagem de respostas morfogênicas, porém os explantes com 8 meses de idade que ainda apresentaram capacidade de formação de brotos, demonstraram comportamento semelhante ao explantes com 2 meses.

#### **4.2. Efeito do tipo de explante e do número de subculturas na morfogênese *in vitro***

Os resultados obtidos neste trabalho (**Tabela 23**) revelaram uma tendência de reduzir a formação de calos e brotos com o aumento do número de subculturas. Essa perda do potencial morfogênético do explante, ao longo do tempo, tem sido frequentemente observada na cultura de tecidos (Rubluo *et al.*, 2002). Segundo Sriskandarajah e Serek (2004), as condições *in vitro* induzem a estabilização das culturas de tecidos que tornam os explantes insensíveis aos reguladores de crescimento, para as atividades regenerativas ou reduzem a sua capacidade de regeneração.

Esses dados, contudo, contrariam os relatos de muitos autores que descrevem os aumento progressivo na capacidade regenerativa dos explantes ao

longo de sucessivas subculturas. Para o gênero *Acacia*, as subculturas aumentam significativamente o número de brotos (Vengadesan *et al.*, 2002). Segundo Sriskandarajah e Serek (2004), longos períodos de cultivo *in vitro* podem induzir uma reversão fisiológica temporária à fase juvenil, que está associada à alta capacidade regenerativa.

Esse comportamento apresentado pela *Tabebuia heptaphylla*, apontando uma tendência de perda do potencial morfogenético do explante ao longo das sucessivas repicagens, contrariando os autores acima citados, pode estar associado ao intervalo entre as subculturas. Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que, para cada espécie, existe um intervalo ideal entre as subculturas, para otimizar a taxa de formação de brotos. Isso porque, segundo os autores, o explante passa por três fases durante a cultura *in vitro*: a fase de restabelecimento após o estresse da excisão, em que não há crescimento ou multiplicação, a fase de regeneração e a fase de senescência. Para maior eficiência na formação de brotos, as repicagens devem ser realizadas durante a fase de regeneração, pois na primeira e na última fase, o explante perderia a capacidade regenerativa (Grattapaglia e Machado, 1998).

No experimento realizado, o período de incubação entre as repicagens foi de 8 semanas. Nagori e Purohit (2004) relataram que para *Annona squamosa*, o intervalo de repicagem ideal para o aumento do número de brotos foi de 3 semanas. Para o gênero *Acacia*, durante o período de incubação de 4 semanas houve incremento na regeneração (Vengadesan, 2002) e, para *Schlumbergera sp.* e *Rhipsalidopsis sp.*, foi observado aumento no número de brotos, ao longo das subculturas, realizadas em intervalos de 6 a 12 semanas (Sriskandarajah e Serek, 2004). Como a tendência, revelada pelos resultados (**Tabela 23**), apontava para o decréscimo no número de brotos ao aumentar o número de subculturas, sugere-se que no período das repicagens, os explantes não estavam na fase de regeneração, assim o tempo de 8 semanas não foi adequado para a propagação.

De acordo com os resultados (**Tabela 23, 24 e 25**), além da porcentagem de formação de brotos ter diminuído ao longo das subculturas, houve também decréscimo na massa fresca, comprimento e número de nós e brotos formados. Segundo Sriskandarajah e Serek (2004) e Malik *et al.* (2005), os explantes, acumulam citocininas durante as repetidas subculturas em meio contendo esse tipo de regulador de crescimento. As citocininas adicionadas ao meio promovem a formação de brotos, porém após a fase de indução, a sua alta concentração



desregula o balanço hormonal endógeno auxina:citocinina, inibindo o crescimento dos brotos regenerados (George, 1993; Grattapaglia e Machado, 1998; Malik *et al.*, 2005). No experimento realizado, os explantes foram repicados sucessivamente para meio de cultura com BAP. Assim, os tecidos dos explantes podem ter acumulado a citocinina durante as subculturas e esse pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a redução da formação de brotos ao longo das subculturas. Malik *et al.* (2005) relatam que para brotos pequenos de *Garcinia indica*, as subculturas em meio sem regulador de crescimento são essenciais para o alongamento desses.

Diante do exposto, sugere-se, para aumentar o potencial regenerativo das subculturas, a adequação do intervalo entre as repicagens e subculturas com BAP intercaladas com subculturas com menor concentração ou ausência de BAP.

#### **4.3. Efeito do tipo de explante cotiledonar e da concentração de BAP na morfogênese *in vitro*.**

Foi observada a expansão dos cotilédones (em volume), nos experimentos de morfogênese sob diferentes concentrações de BAP (**Tabela 26**). Devido à premissa de que a citocinina promove a expansão celular em folhas e cotilédones (Taiz e Zeiger, 2004), a expansão dos tecidos cotiledonares após sua inoculação, já era esperada, porém houve expansão também em explantes na ausência de BAP, o que indica que o nível hormonal endógeno do cotilédone foi suficiente para iniciar as divisões celulares e conseqüentemente gerar o crescimento do tecido. Negussie (1997) também aponta essa tendência. O autor relata a excessiva expansão dos cotilédones de *Juniperus excelsa*, após 7-15 dias de cultura MS sem adição de regulador de crescimento. O mesmo ocorreu para cotilédones de *Anacardium occidentale*, que com 10 dias de cultura apresentaram expansão do explante (Ananthakrishnan *et al.*, 2002).

A presença de BAP exerceu efeito positivo na formação de calos e brotos (**Tabela 27**). Negussie (1997) relata que a presença de BAP estimula a formação de brotos em cotilédones de *Juniperus excelsa*. Valdés *et al.* (2001) reportam que para cultura de cotilédones de *Pinus pinea*, a concentração mínima de BAP necessária para induzir a formação de calos é de 0,4  $\mu\text{M}$  e que altas porcentagens de formação de brotos são obtidos com 44,4  $\mu\text{M}$  de BAP.

É importante ressaltar que o tempo de cultivo do embrião do qual será excisado o cotilédone influencia no seu potencial morfogênético. Para *Pinus pinea*, há uma redução no número de respostas dos cotilédones com o aumento do tempo de cultura dos embriões (Valdés *et al*, 2001). Negussie (1997) utilizou os cotilédones de plântulas de *Juniperus excelsa* com 5-9 dias de idade, já Valdés *et al*. (2001) inocularam cotilédones de embriões de *Pinus pinea* com até 6 dias de cultura. Em ambos os trabalhos houve respostas morfogênicas. Nesse trabalho, os cotilédones utilizados para os experimentos foram excisados de plântulas com 7 dias, o que pode sugerir que a utilização de explantes mais jovens eleve a produção de brotos.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que explantes oriundos de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* perdem gradativamente o seu potencial morfogênético com o tempo de cultura, exceto os explantes contendo as gemas apicais. Assim, apesar da capacidade de sobrevivência da planta *in vitro* por até 8 meses de idade, a espécie não conserva o potencial morfogênético dos seus propágulos vegetativos durante esse período, o que não é vantajoso para a conservação. Para a micropropagação recomenda-se o uso de explantes advindos de plantas matrizes jovens.

Após sucessivas subculturas, os explantes de *Tabebuia heptaphylla* demonstraram uma tendência de reduzir a formação de calos e brotos, indicando uma perda gradativa no seu potencial morfogênético. Sugere-se, para aumentar o potencial regenerativo das subculturas, a adequação do intervalo entre as repicagens e intercalar subculturas com BAP com subculturas com menor ou ausência de BAP.

Os cotilédones oriundos de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 7 dias de idade (contados a partir da emissão da radícula) não demonstraram eficácia na micropropagação e na produção de calos. Acredita-se que a idade da plântula da qual foi excisado o cotilédone não foi adequado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTHAKRISHNAN, G.; RAVIKUMAR, R.; GIRIJA, S.; GANAPATHI, A. *In vitro* adventitious shoot formation from cotyledon explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**. n. 93, p. 343-355, 2002.

ANTHONY, J. M.; SENARATNA, T.; DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K. The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* (Ericaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 78, 247-252, 2004.

BOHUS, O.; BENSON, E.; MILLAM, S.; PRET'OVA, A. BREMNER, D. H. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hidroxyonemal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**. n. 162, p. 537-547, 2005.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture (Part 1) The Technology**. 2 ed. Edington: Exegetics Limited 574p. 1993.

GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. **Statistical Procedures for Agricultural Research**. Singapore: John Wiley & Sons, 660p., 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos e plantas**. Brasília: Embrapa, p. 183-260, 1999.

IBRAHIM, R.; DEBERGH, P. C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). **Scientia Horticulturae** n. 88 p. 41-57, 2001

KANTHARAJAH, A. S.; GOLEGAONKAR, P. G. Somatic embryogenesis in eggplant (Review) **Scientia Horticulturae**. N. 99, p. 107-117, 2004.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) – **Cultura**

**de Tecidos e Transformação genética de Plantas.** Brasília: Embrapa, v. 2, p.519-531, 1998.

MALIK, S.K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R.K. Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**. n. 106, p. 539-553. 2005.

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

NAGORI, R.; PUROHIT, S. D.; *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae**. n. 99, p. 89-98, 2004.

NEGUSSIE, A. In vitro induction of multiple buds in tissue culture of *Juniperus excelsa*. **Forest Ecology and Management**. N. 98, p. 115-123, 1997.

RUBLUO, A.; MARÍN-HERNÁNDEZ, T.; DUVAL, K.; VARGAS, A. MÁRQUEZ-GUZMÁN, J. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejoara (Cactaceae). **Scientia Horticulturae**. n. 95, p. 341-349, 2002.

SAINI, R. JAIWAL, P. K. Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper ) determines its morphogenic response. **Plant science**, n. 163 p. 101-109, 2002.

SRISKANDARAJAH, S.; SEREK, M. Regeneration from phylloclade explant and callus cultures of *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 78, p. 75-81, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

VALDÉS, A. E.; ORDÁS, R. J.; FERNÁNDEZ, B.; CENTENO, M. L. Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. **Plant Physiol. Biochem.** n. 39, p. 377-384, 2001.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S. SELVARAJ,N. *In vitro* propagation of *Acacia* species – a review. **Plant Science.** n. 163, p. 663-671, 2002.

## CONSERVAÇÃO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Tabebuia heptaphylla* (VELOZZO) TOLEDO (BIGNONIACEAE)

### 1. INTRODUÇÃO

Na área de recursos genéticos, a conservação *in vitro* tem se estabelecido como uma alternativa à conservação em bancos de germoplasma no campo, apresentando vantagens econômicas e práticas (Withers e Williams, 1998). A manutenção de culturas *in vitro* é mais segura que a manutenção *in vivo* e possibilita a conservação de espécies de difícil transporte e manutenção em campo, e de espécies propagadas essencialmente de forma vegetativa ou que produzem sementes recalcitrantes (Pence, 1999; Withers e Williams, 1998).

A técnica de armazenamento, com crescimento mínimo, tem sido aplicada com sucesso na preservação *in vitro*, a médio prazo, em espécies ameaçadas ou de interesse econômico (Pence, 1999). Nunes *et al.* (2003) relataram taxa de sobrevivência de 44% para gemas apicais de *Cedrela fissilis* (Vellozo) armazenadas por 6 meses. Altas taxas de sobrevivência foram obtidas por Maruyama *et al.* (1997) na conservação por 12 meses de *Cedrela odorata* L. (80%) e por 6 meses de *Guazuma crinita* Mart. (90%) e *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don (70%).

A estratégia empregada na conservação *in vitro* com restrição de crescimento está baseada no controle dos principais fatores ambientais que afetam o crescimento e a morfogênese, entre eles as condições físicas do ambiente, como luminosidade e temperatura, os nutrientes, trocas gasosas e inibidores de crescimento (George, 1993; Withers e Williams, 1998; Taiz e Zeiger, 2004).

A redução da temperatura tem sido eficiente e amplamente empregada para conservação *in vitro*, desacelerando o metabolismo celular e diminuindo o seu crescimento. A redução da temperatura também diminui a evaporação do meio de cultura (George, 1993; Withers e Williams, 1998). Ashmore (1998) relata que um grande número de genótipos de *Dioscorea rotundata* e *D. alata* podem ser preservados *in vitro* à temperatura de 18-24<sup>0</sup>C e Pattmaik e Chand (2000) demonstraram que gemas axilares encapsuladas de *Morus alba*, *M. australis* e *M. cathyana* podem ser armazenadas por 60 dias e *M. bombycis*, *M. latifolia* e *M. nigra* por 90 dias a 4<sup>0</sup>C.

A baixa intensidade luminosa também contribui para a eficiência do armazenamento *in vitro*. Gemas encapsuladas de *Eucalyptus grandis* armazenadas em baixa temperatura (10 °C) e baixa intensidade luminosa (4  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), mantém a sua viabilidade por mais de 3 meses (Watt *et al.*, 2000).

As trocas gasosas entre o ambiente *in vitro* e o externo é uma condição importante a ser observada durante a conservação. O acúmulo de etileno pode induzir alterações morfogênicas (George, 1993; Withers e Williams, 1998; Taiz e Zeiger, 2004).

A aplicação de retardantes osmóticos e hormonais nos meios de cultura é outra estratégia utilizada para reduzir o crescimento e aumentar o intervalo entre as repicagens. Frequentemente são utilizados o manitol, o sorbitol, a sacarose e reguladores de crescimento como o BAP e o ácido abscísico. Watt *et al.* (2000), relatam que explantes de *Eucalyptus grandis* podem ser armazenadas por mais de 10 meses em meio de cultura com adição de 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido abscísico. A *Dioscorea alata* pode ser conservada *in vitro* por 9 meses, com alta taxa de regeneração (98-100%) em meio com manitol a 1,5% ; 1 ou 0,1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP e 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de carvão ativado (Borges *et al.*, 2004).

A conservação *in vitro* através da restrição do crescimento, apesar de ter apresentado sucesso em muitos casos, apresenta problemas como alto risco de variação somaclonal . Além disso, essa metodologia não oferece condições para o armazenamento a longo prazo (Withers e Williams, 1998).

Poucos trabalhos abordando conservação *in vitro* de espécies da família Bignoniaceae tem sido publicados. Maruyama *et al.* (1997) reportaram em seu trabalho de conservação germoplasma *in vitro*, que gemas apicais encapsuladas de *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don, armazenadas por 6 meses a 20 °C mantem a viabilidade com taxa de regeneração de 70%.

Outra alternativa para a conservação de germoplasma é a criopreservação de sementes. Essa técnica consiste na conservação das sementes em nitrogênio líquido a -196 °C, ou na sua fase vapor a -150 °C.

A criopreservação, tem tido destaque entre os métodos de conservação de sementes, pois oferece um potencial para a preservação sem limites de tempo, já que, a essas temperaturas, há uma redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração fisiológica é praticamente paralisada (Withers e Williams, 1998; Santos, 2000).

Além de aumentar o tempo de armazenamento, a criopreservação pode em algumas espécies, aumentar o poder germinativo das sementes. Gonzalez-Benito *et al.* (1998) verificaram que em duas espécies, *Cistus osbeckiifolius* e *Helianthemum polygonoides*, havia uma relação entre a criopreservação e a quebra de dormência de sementes. Essa relação também foi observada por Reed *et al.* (2001), que avaliaram a germinação de sementes de *Pyrus communis*, e constataram que todas as sementes criopreservadas, germinaram significativamente melhor que as sementes do grupo controle.

A imersão em nitrogênio líquido pode melhorar a germinação das sementes, pela quebra da dormência. Além disso a exposição ao nitrogênio líquido pode causar um aumento na absorção de água através de fissuras formada na testa da semente durante o congelamento, provocando um aumento da taxa de germinação (Reis e Cunha, 1997).

A exposição do material biológico a baixas temperaturas, entretanto, pode causar danos às células, principalmente pela formação de cristais de gelo em seu interior (Hopkins, 1999). Decruse *et al.* (1999), demonstraram em *Rauvolfia micrantha* e *Embelia ribes*, que havia uma relação entre a umidade das sementes e a sua tolerância a esse processo. O mesmo já tinha sido observado por Wang *et al.* (1998) para sementes de *Dendrobium candidum* com 43% de umidade, as quais não haviam sobrevivido à exposição ao nitrogênio líquido, enquanto que sementes dessecadas a 8-19% obtiveram alta taxa de sobrevivência.

O sucesso da técnica de criopreservação, depende inicialmente, da capacidade das sementes de resistir à desidratação e à baixa temperatura (Marzalina e Krishnapillay, 1999). Kim *et al.* (2002), em seu estudo com sementes e eixos embrionários de *Camellia sinensis* L., verificaram que as sementes eram extremamente sensíveis à desidratação e não sobreviveram ao tratamento.

Técnicas como o congelamento lento, a vitrificação e o encapsulamento-desidratação, foram desenvolvidas a fim de evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, viabilizando o processo de criopreservação.

A grande importância das técnicas de criopreservação de sementes está em aumentar o tempo de armazenamento, viabilizando a conservação *ex situ* de espécies a longo prazo. Assim, este trabalho procurou avaliar a conservação *in vitro* de propágulos vegetativos de *Tabebuia heptaphylla* e a criopreservação de sementes como alternativas para a conservação da espécie.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Conservação de propágulos vegetativos *in vitro*

O experimento de conservação *in vitro* de explantes de *Tabebuia heptaphylla* foi realizado através do encapsulamento dos explantes em alginato de cálcio.

#### 2.1.1. Encapsulamento em alginato de cálcio

Foram excisados segmentos com aproximadamente 0,5 cm, do caule de planta *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla*, com 2 meses de idade, contendo a gema apical, o primeiro nó foliar e o nó cotiledonar. Esses segmentos foram encapsulados em alginato de cálcio.

O processo de encapsulamento consistiu na imersão dos explantes em solução com meio de cultura MS/2 e 40 mg.L<sup>-1</sup> de alginato de sódio. Em seguida, alíquotas de 0,2 mL da solução descrita, contendo um explante, foram coletadas, com o auxílio de uma pipeta e transferidas para solução estéril de cloreto de cálcio a 14 mg.L<sup>-1</sup> e mantidas nessa solução por 30 minutos para que ocorresse a polimerização.

#### 2.1.2. Condições de armazenamento

As cápsulas contendo a gema apical e os nós foliar e cotiledonar foram armazenadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), com 10 ml de meio MS/2 sem adição de sacarose, suplementados com 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel por um período de 6 meses, em geladeira (5<sup>o</sup>C) e em sala de crescimento (25<sup>o</sup>C).

#### 2.1.2. Regeneração

Após o período de armazenamento, as cápsulas, cada uma contendo um único explante foram transferidas para meio de regeneração MS suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel e 1,11 µM de BAP. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem que ocorreu por 18 minutos a 120<sup>o</sup>C.

A porcentagem de regeneração (explantes que originaram brotos) foi avaliação a cada 7 dias. Foram utilizadas 3 repetições com 10 cápsulas para cada tipo de explante e para cada temperatura de armazenamento. Os dados obtidos foram previamente transformados em arc sen √% e submetidos à Análise de

Variância (Anova), com separação das médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Gomez e Gómez, 1984).

## 2.2. Criopreservação de Sementes

### 2.2.1. Condições de armazenamento das sementes

As sementes de *Tabebuia heptaphylla* fornecidas pelo Instituto Florestal de São Paulo, coletadas na Floresta Estadual de Avaré, município de Avaré/SP, foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas em geladeira à temperatura de 5°C por períodos de 22, 26, 105 e 120 semanas, contados a partir da data da coleta.

### 2.2.2. Teor de água das sementes

Após o armazenamento em geladeira, foi determinado o teor de água das sementes com 20, 26, 105 e 120 semanas.

Inicialmente, foi estabelecida a massa da matéria fresca e em seguida as sementes foram colocadas em estufa para secar por um período de 16 horas a 103°C para determinação da massa seca (Reed *et al.*, 2001). Foram utilizadas 3 repetições de 25 sementes armazenadas por 20 e 26 semanas e 4 repetições de 20 sementes armazenadas por 105 e 120 semanas.

O teor de água foi determinado pela diferença entre a massa fresca e a massa seca, dividido pela massa fresca (Reed *et al.*, 2001), expresso pela fórmula:

$$\text{Teor de água (\%)} = (\text{massa fresca} - \text{massa seca}) / \text{massa fresca} \times 100$$

### 2.2.3. Processo de criopreservação

Sementes de *Tabebuia heptaphylla*, armazenadas em geladeira por períodos de 22, 26, 105 e 120 semanas, sofreram o processo de criopreservação, que consistiu na imersão direta das sementes em nitrogênio líquido por 60 minutos e no descongelamento lento, à temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos.

As sementes criopreservadas foram postas para germinar em placas de Petri, sobre papel filtro embebidos com água destiladas e mantidas em sala de crescimento, dispendo de lâmpadas fluorescentes Phillips TDL ( $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e exposta ao fotoperíodo de 16 horas. Simultaneamente, foram postas para germinar,

nas mesmas condições, sementes do mesmo lote e tempo de armazenamento em geladeira, mas que não sofreram o processo de criopreservação (grupo controle).

A germinação foi monitorada diariamente até a estabilização da mesma. Foram utilizadas 5 repetições de 25 sementes cada tratamento. Os dados obtidos foram previamente transformados em  $\arcsin \sqrt{\%}$  e submetidos à Análise de Variância Multifatorial, com separação das médias pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) (Gomez e Gómez, 1984). Para cada tratamento foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

#### **2.2.4. Determinação do Índice de Velocidade de Germinação**

Para cada repetição dos experimentos de germinação de sementes maduras foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG), empregando a fórmula de Maguire (1996 *apud* Nakagawa, 1999):  $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$ .

Onde :  $G_1, G_2, G_n$  = número de plântulas que emitiram radícula, computadas na primeira contagem, na segunda e na última contagem.

$N_1, N_2, N_n$  = número de dias da inoculação da semente ou embrião no meio de cultura à primeira contagem, à segunda e à última contagem.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Conservação de propágulos vegetativos *in vitro*

Segmentos contendo a gema apical ou os nós foliar e cotiledonar, encapsulados em alginato de cálcio e armazenados em geladeira (5<sup>0</sup>C) por 6 meses, perderam a sua capacidade de regeneração, apresentando 100% de explantes oxidados.

Quanto aos explantes encapsulados e armazenados em temperatura ambiente (25<sup>0</sup>C), a porcentagem de regeneração foi reduzida, iniciando-se na 3<sup>a</sup> semana após a transferência para o meio de regeneração e apresentando valores entre 3,33 e 13,33%. Os resultados não mostraram diferenças estatísticas entre os diferentes tipos de explantes na capacidade de regeneração, nessas condições (**Tabela 28**).

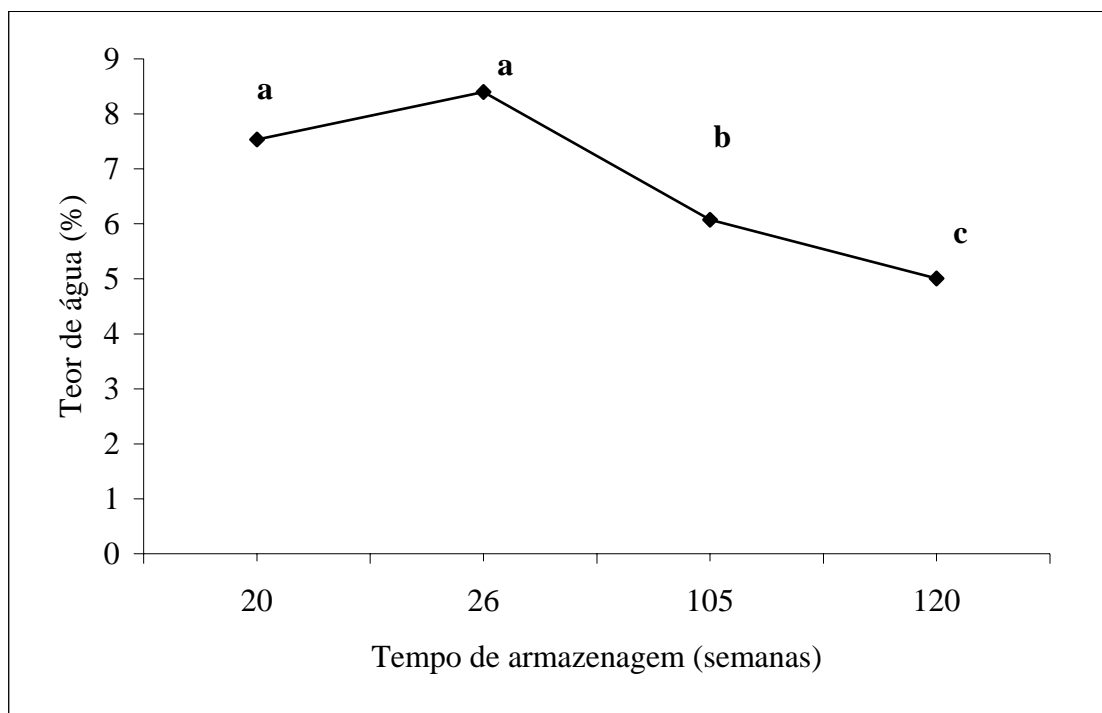
**Tabela 28.** Porcentagem de regeneração em meio MS com 1,11 µM de BAP, de segmentos contendo a gema apical ou os nós foliares e cotiledonares, encapsulados em alginato de cálcio e armazenados por 6 meses em temperatura ambiente (25<sup>0</sup>C).

Tipo de explante	Tempo (dias)*					
	7	14	21	28	35	42
NA	0	0	3,33 a	3,33 a	3,33 a	3,33 a
NF	0	0	0	3,33 a	6,67 a	6,67 a
NC	0	0	3,33 a	6,67 a	13,33 a	13,33 a

\* Média de 3 repetições com 10 explantes cada. Valores seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan ao nível de 5%. NA= segmento caulinar contendo a gema apical; NF= segmento caulinar contendo os nós foliares e NC= segmento caulinar contendo os nós cotiledonares.

#### 3.2. Criopreservação de Sementes

Sementes de *Tabebuia heptaphylla* armazenadas em geladeira (5<sup>0</sup>C) apresentaram um teor de água de 7,53% na 20<sup>0</sup> semana de armazenamento. Esse valor não diferiu estatisticamente do teor de água de 8,4% apresentado pelas sementes na 26<sup>0</sup> semana. Após esse período, o teor de água das sementes diminuiu significativamente, apresentando taxa de 6,07% de água ao serem avaliadas com 105 semanas. Sementes avaliadas com 120 semanas apresentaram teor de água de 5,01%, estatisticamente diferente das com 105 semanas (**Figura 14**).



**Figura 19.** Teor de água de sementes de *Tabebuia heptaphylla* com 20, 26, 105 e 120 semanas após a coleta, armazenadas em sacos plásticos, na geladeira a 5 °C. Média de 3 repetições de 25 sementes armazenadas por 20 e 26 semanas e 4 repetições de 20 sementes armazenadas por 105 e 120 semanas. Valores seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente entre si pelo teste Duncan ao nível de 5%.

A capacidade de germinação das sementes de *Tabebuia heptaphylla* criopreservadas e não criopreservadas foi afetada pela interação entre o tempo de armazenamento e o processo de conservação (presença ou ausência de criopreservação) (**Apêndice I**). A germinação máxima das sementes diminuiu ao longo do tempo de armazenamento, tanto para as criopreservadas como para as não criopreservadas. Porém, para as criopreservadas, não houve diferença entre o armazenamento por 22 e 26 semanas e entre 105 e 120 semanas. Já no caso das sementes não criopreservadas, apenas as armazenadas por 22 e 26 semanas não apresentaram germinação estatisticamente diferentes (**Tabela 29**).

A criopreservação afetou apenas a germinação das sementes armazenadas por 22 e 120 semanas. Entre sementes com 26 e 105 semanas não houve diferenças estatísticas entre os processos de conservação (**Tabela 29**).

Em termos de velocidade de germinação, não houve diferenças significativas entre a presença ou ausência de criopreservação, em todos os tempos de armazenamento. Para as sementes não criopreservadas não houve diferenças entre as armazenadas por 22 e 26 semanas e as com 105 e 120 semanas. O mesmo comportamento foi observado nas sementes criopreservadas (**Tabela 29**).

**Tabela 29.** Germinação máxima (%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes armazenadas em geladeira por 22, 26, 105 e 120 semanas, criopreservadas (+NL) e não criopreservadas (-NL) por 60 minutos.

<b>Tempo de armazenamento (semanas)</b>	<b>Processo</b>	<b>Germinação Máxima (%)*</b>	<b>IVG*</b>
<b>22</b>	<b>+NL</b>	57,6 c	3,83 d
	<b>-NL</b>	69,6 d	3,75 cd
<b>26</b>	<b>+NL</b>	57 c	3,28 cd
	<b>-NL</b>	62 cd	3,20 c
<b>105</b>	<b>+NL</b>	45,6 b	1,99 b
	<b>-NL</b>	42,4 b	1,63 ab
<b>120</b>	<b>+NL</b>	42,4 b	1,80 ab
	<b>-NL</b>	32,8 a	1,28 a

\*Média de 5 repetições com 25 sementes cada. Valores da mesma coluna, seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Conservação de propágulos vegetativos *in vitro*

Os segmentos caulinares encapsulados em alginato de cálcio, contendo a gema apical, e os nós foliares e cotiledonares não mantiveram a sua viabilidade após 6 meses de armazenamento (**Tabela 28**). Esse comportamento das Bignoniaceae foi relatado por Maruyama *et al.* (1997), que demonstraram a perda da capacidade de regeneração do *Jacaranda mimosafolia* em meio de armazenamento B5. Os autores porém conseguiram regenerar plantas armazenando as cápsulas em meio composto somente por água e ágar a 1%.

Para os explantes armazenados em geladeira (5<sup>o</sup>C), não houve regeneração de plantas após o tempo de armazenagem. Os segmentos nodais e a gema apical, nessas condições, apresentaram coloração escura, entre o marrom e preto, o que sugere a necrose dos tecidos.

Hopkins (1999) afirma que muitas espécies, principalmente as nativas de ambientes tropicais, são sensíveis à baixa temperatura; e quando expostas a temperaturas abaixo de 15 <sup>o</sup>C exibem sinais de injúrias, que em casos extremos podem causar a morte dos tecidos ou mesmo da planta. Essa sensibilidade ao frio se deve a composição de sua camada de membrana, que apresenta lipídios com alta porcentagem de cadeias de ácidos graxos saturados. As membranas nessa composição tendem a solidificar em um estado semicristalino, mesmo a temperatura de 15-10 <sup>o</sup>C, o que pode causar desde o mau funcionamento dos seus componentes protéicos, inibindo as atividades celulares, até o seu rompimento e conseqüente morte da célula (Hopkins, 1999; Taiz e Zeiger, 2004).

Em relação aos explantes armazenados em temperatura ambiente (25 <sup>o</sup>C), houve baixa porcentagem de regeneração (**Tabela 28**), o que indica a necessidade do desenvolvimento de outra metodologia de armazenamento, porém a ocorrência de regeneração em alguns explantes, mesmo que em baixa porcentagem, e o desenvolvimento de plantas visualmente normais, pode indicar que o meio de regeneração é adequado e que as cápsulas de alginato de cálcio não impediram as trocas de nutrientes, água e BAP entre o meio de cultura e os explantes.

Apesar de não ser observado diferenças estatísticas na porcentagem máxima de regeneração entre os tipos de explante, a gema apical e o nó cotiledonar, iniciaram a regeneração na 3<sup>o</sup> semana, enquanto que o nó foliar teve início na 4<sup>o</sup> semana (**Tabela 28**). Esses dados reafirmam a premissa de que explantes

encapsulados de diferentes origens requerem diferentes protocolos (Nunes *et al.*, 2003).

#### 4.2. Criopreservação de Sementes

Houve a desidratação das sementes de *Tabebuia heptaphylla* armazenadas em geladeira, apesar de terem sido acondicionadas em sacos plásticos (**Figura 14**). Notou-se também a perda gradativa de sua viabilidade (baseada na porcentagem de germinação) ao longo do tempo de armazenagem. Esses resultados eram esperados, visto que alguns autores já haviam relatado o baixo potencial de armazenamento das sementes dessa espécie (Carvalho, 1994; Lorenzi, 1998).

O teor de água da semente é considerado por Stanwood (1987) um fator limitante para a conservação do germoplasma, através da técnica de criopreservação. Segundo o autor, a tolerância da semente a esse processo está relacionada ao seu nível de umidade, existindo para cada espécie um teor mínimo e máximo de água, na qual as sementes podem ser criopreservadas sem afetar a sua viabilidade.

A capacidade de germinação das sementes foi influenciada pela interação dos fatores: tempo de armazenamento e exposição ao nitrogênio líquido (**Apêndice I**). As sementes armazenadas por 26 e 105 semanas não foram afetadas pela criopreservação (**Tabela 29**). Essas sementes apresentavam, no momento da aplicação da técnica, teores de água de 8,4 e 6,7% respectivamente, sugerindo que para *T. heptaphylla*, esses níveis de umidade são adequados para criopreservação direta, sem a necessidade de tratamento prévio da semente. Resultados semelhantes foram relatados por Higa (2004) que obteve sucesso na criopreservação direta de sementes dessa espécie com teor de água entre 7,3 e 8,8%.

Contrariando os resultados apresentados pelas sementes armazenadas por 26 e 105 semanas, foi observado que no armazenamento por 22 semanas, as sementes criopreservadas, apresentaram germinação máxima inferior as que não sofreram a criopreservação (**Tabela 29**), apesar do teor de água não ter variado estatisticamente entre a 20<sup>o</sup> e a 26<sup>o</sup> semana de armazenamento. Essa diferença, porém é reduzida, sendo detectada apenas pelo teste de Duncan. A aplicação do teste Tukey e o teste t de student, não perceberam diferenças. Além disso, outros fatores, podem ter afetado minimamente, a germinação das sementes.



Pequenas diferenças, detectadas apenas no teste de Duncan, também foram observadas em sementes armazenadas por 120 dias. Neste caso, porém, as sementes criopreservadas apresentaram porcentagem de germinação superior as não criopreservadas, indicando um aumento da germinação com a aplicação da técnica (**Tabela 29**). Esse comportamento foi verificado também na germinação de sementes de *Pyrus communis* (Reed *et al.* 2001).

A imersão em nitrogênio líquido pode ter melhorado a germinação das sementes tratadas, pela quebra da dormência das mesmas. Porém como as sementes armazenadas por 26 e 105 semanas não apresentaram diferenças entre os tratamentos, possivelmente esse não foi o fator que as distinguiram.

Baseado nos relatos de Reis e Cunha (1997), o aumento da germinação em sementes criopreservadas pode ter sido devido ao aumento na absorção de água através de fissuras na testa da semente, formadas durante o congelamento. Entretanto, como as diferenças não foram significativas para o teste Tukey e teste t de student, para sementes armazenadas por 120 semanas, outros fatores podem ter afetado a germinação de forma reduzida, sugerindo que a criopreservação não afetou a germinação das sementes.

Essa hipótese é reforçada com a avaliação dos índices de velocidade de germinação. Os dados obtidos nos resultados (**Tabela 29**), revelam que a velocidade de germinação das sementes não foi alterada pela criopreservação, sofrendo influência apenas do tempo de armazenagem.

## 5. CONCLUSÕES

A metodologia empregada nesse trabalho, não foi eficiente para a conservação *in vitro* de propágulos vegetativo de *Tabebuia heptaphylla* por 6 meses. A baixa temperatura e a ausência de um pré-tratamento para evitar a oxidação dos explantes prejudicaram a viabilidade dos propágulos.

A criopreservação de sementes de *Tabebuia heptaphylla* pode ser considerada uma alternativa para a conservação da espécie, já que suas sementes possuem baixo potencial de armazenamento em condições naturais e toleram a criopreservação, mesmo após 120 semanas de coleta. Assim é possível criopreservar lotes de sementes que estão perdendo a viabilidade.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHMORE, S. E. The status of *in vitro* conservation of tropical and subtropical species. **Acta Hort**, (ISHS) n. 461 p. 477-483, 1998.

CARVALHO, P. E. R. **Especies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília, D.F.: Embrapa-SPI, 639p., 1994.

DECRUSE, S. W.; SEENI, S.; PUSHANGADAN, P. Effects of cryopreservation on seed germination of selected rare medicinal plants of India. **Seed Science and Technology**, n. 27, p. 501-505, 1999.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture (Part 1) The Technology**. 2 ed. Edington: Exegetics Limited 574p. 1993.

GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. **Statistical Procedures for Agricultural Research**. Singapore: John Wiley & Sons, 660p., 1984.

GONZALEZ-BENITO, M. E.; IRIONDO, J. M.; PÉREZ-GARCIA. Seed cryopreservation: an alternative method for the conservation of Spanish endemics. **Seed Science and Technology**, n. 26, p. 257-262, 1998.

HIGA, T.C. **Criopreservação de sementes e crescimento inicial de plantas de *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae)**. 50 p., 2004 (Monografia – Graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina, SC)

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology**. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1999.

KIM, H. H.; CHAN, Y. S.; BAEK, H. J.; CHO, E. G.; CHAE, Y. A.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of tea (*Camellia sinensis* L.) Seeds and embryonic axes. **Cryoletters**. n. 23, p. 209-216, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2ed. São Paulo: Plantarum, v. 1, 352p. 1998.

MARUYAMA, E; KINOSHITA, I; ISHII, K; OHBA, K; SAITO, A. Germoplasm conservation of the tropical Forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *jacaranda mimosaeifolia* D. Don., shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25°C. **Plant Cell Report**, 16: 393-396, 1997.

MARZALINA, M.; KRISHNAPILLAY, B. Recalcitrant Seed Biotechnology Applications to Rain Forest Conservation. In: BENSON, E. E. (Ed.) **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor & Francis, p. 265-276, 1999.

NUNES, E., C.; BENSON, E., E.; OLTRAMARI, A., C.; ARAUJO, P., S., RIGHETTO, M.; VIANA, A., M. In vitro conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 12p. 837-846,2003.

PATTNAIK, S.; CHAND, P. K. Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. N. 60 p. 177-185, 2000.

PENCE, V. C. The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. In: **Plant Conservation Biotechnology**. London: Taylor & Francis, cap. 6, p. 83-95, 1999.

REED, B. M.; SCHAWANKE, S.; SHALA, R. Pear seeds retain viability after liquid nitrogen immersion. **HortScience**, v. 36, n. 6, p. 1121-1122, 2001.

REIS, A., M. M.; CUNHA, R. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. com diferentes conteúdos de umidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Embrapa, v. 32, n. 10, 1997.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e Perspectivas para a Conservação de Germoplasma Vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.12 (edição especial) p. 70-84, 2000.

STANWOOD, P. C. Survival of Sesame Seeds at the temperature (-196 °C) of Liquid Nitrogen. **Crop Science**. V. 27, p. 327-331, 1987.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

WANG, J. H.; GE, J. G; LIU, F.; BIAN, H.W.; HUANG, C. N. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. **CryoLetters**, n. 19, p. 123-128. 1998.

WATT, M. P.; THOKOANE, N. L.; MYCOCK, D.; BLAKEWAY, F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** n. 61 p. 161-164, 2000.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds. ) – **Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 297-330, 1998.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A devastação da Mata Atlântica e a perda irreversível dos recursos genéticos, têm preocupado vários setores da sociedade, que nos últimos anos vêm apoiando pesquisas que objetivem ampliar os conhecimentos e desenvolver novas metodologias de propagação e conservação de suas espécies nativas. Porém ainda há uma carência de conhecimentos sobre a ecologia e a biologia reprodutiva de muitas espécies, o que tem limitado o avanço científico e a implementação de programas de conservação.

Poucos trabalhos referentes à biologia reprodutiva, propagação e conservação de *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo foram encontrados na literatura consultada. As informações existentes, em geral, limitavam-se à coleta e conservação de sementes, citadas como método de propagação utilizado com maior frequência. Nesse sentido, os resultados obtidos nesse trabalho são importantes contribuições para ampliar o conhecimento sobre essa espécie. Além disso, abrem novas perspectivas para a propagação e conservação, com a utilização da cultura *in vitro* e da criopreservação.

O monitoramento da fase reprodutiva da árvore de *Tabebuia heptaphylla*, realizado nesse trabalho, possibilitou a descrição do desenvolvimento das flores e frutos, e revelou a ausência de um padrão fenológico rígido de um ano para o outro. Contudo, ainda há a necessidade de estudos complementares utilizando outros genótipos, a fim de confirmar para a espécie, os resultados obtidos nesse estudo.

Os resultados do estudo de micropropagação a partir de segmentos nodais do caule de *Tabebuia heptaphylla* foram positivos, apresentando altas porcentagens de plantas regeneradas, porém, o mesmo não foi observado para culturas de segmentos cotiledonares e radiculares. Novos estudos, visando ajustar o meio de cultura e caracterizar a qualidade fisiológica do explante são necessários para otimizar a regeneração de plantas a partir de cotilédones e raízes.

O estudo de conservação de propágulos vegetativos *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* revelou que segmentos caulinares encapsulados em alginato de cálcio perderam sua viabilidade após 6 meses de armazenamento; assim, novos estudos são necessários, com o objetivo de determinar o efeito do tempo de armazenamento e do meio de cultura, na viabilidade dos explantes. A adição de carvão ativado e de

citocininas no meio de cultura pode ser considerado em estudos futuros de conservação *in vitro*, a fim de evitar a oxidação dos explantes ou o rebrotamento precoce.

## APÊNDICE

**Apêndice A.** Germinação máxima *in vitro* de sementes imaturas, oriundas de frutos com 70, 65, 60 e 55 dias após a abertura do botão floral, em meio WPM suplementado com BAP nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ .

Fatores	Níveis	Germinação (%)*
Idade do fruto	70 dias	15a
	65 dias	8,6b
	60 dias	4c
	55 dias	2,2d
Concentração de BAP ( $\mu\text{M}$ )	0	1,75a
	2	4,5b
	4	12,5c
	8	14,25d
	16	4,25b

### Interação: Idade do fruto x Concentração de BAP

70 dias BAP0	6bc
70 dias BAP2	11c
70 dias BAP4	34e
70 dias BAP8	18d
70 dias BAP16	6bc
65 dias BAP0	1a
65 dias BAP 2	6bc
65 dias BAP4	10c
65 dias BAP8	20d
65 dias BAP16	6bc
60 dias BAP0	0a
60 dias BAP2	1a
60 dias BAP 4	4b
60 dias BAP8	11c
60 dias BAP 16	4b
55 dias BAP0	0a
55 dias BAP2	0a
55 dias BAP4	2a
55 dias BAP8	8c
55 dias BAP16	1a

\* Interação significativa. Média de 5 repetições com 20 sementes cada. Valores seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Duncan.

**Apêndice B.** Diâmetro dos calos (mm) formado a partir de sementes imaturas de *Tabebuia heptaphylla*, com 0, 7, 14 e 21 dias em meio gelificado WPM suplementado com 0, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$  de BAP.

Fatores	Níveis	Diâmetro do calo* (mm)
Tempo (dias)	0	8,12a
	7	9,16b
	14	10,88c
	21	14,27d
Concentração de BAP ( $\mu\text{M}$ )	0	9,70a
	2	11,88d
	4	10,92c
	8	10,42bc
	16	10,13ab

**Interação: Tempo x Concentração de BAP**

0 dias BAP 0	8,20a
0 dias BAP 2	8,14a
0 dias BAP 4	8,22a
0 dias BAP 8	8,26a
0 dias BAP 16	7,78a
7 dias BAP 0	9,14abc
7 dias BAP 2	9,86bc
7 dias BAP 4	8,74ab
7 dias BAP 8	9,08abc
7 dias BAP 16	8,99abc
14 dias BAP 0	10,03bcd
14 dias BAP 2	12,83f
14 dias BAP 4	11,32de
14 dias BAP 8	9,99bcd
14 dias BAP 16	10,23cde
21 dias BAP 0	11,44e
21 dias BAP 2	16,69i
21 dias BAP 4	15,39h
21 dias BAP 8	14,34gh
21 dias BAP 16	13,50fg

\* Interação significativa. Média de 40 calos. Valores seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Duncan.

**Apêndice C.** Respostas morfogênicas obtidas a partir da cultura de segmentos caulinares contendo os nós apicais, foliares e cotiledonares, com 2 meses de idade, avaliados após 60 dias de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.

Fatores	Níveis	Expansão do caule (%)*	Formação de Calos (%)*	Formação de Brotos (%)*	Número de brotações*
<b>Regulador de Crescimento</b>	BAP	12,08a	53,75b	80,42b	2,42b
	CIN	23,13b	30,42a	69,17a	1,37a
<b>Concentração (µM)</b>	0	0a	0a	54,17a	1,40a
	1	17,08b	49,17b	73,75b	2,17b
	2	27,08b	62,92c	88,33c	2,12b
	4	25,17b	51,79bc	77,41b	1,98b
<b>Explante</b>	NA	9,64a	60,36a	84,64b	1,17a
	NF	21,79b	44,29a	71,79a	2,52c
	NC	28,93b	39,64a	76,79a	2,06b

**Interação: Tipo de regulador de crescimento x Concentração x Tipo de explante**

Controle apical	0a	0a	60,0b	1,00a
Controle foliar	0a	0a	40,0a	1,70ab
Controle cotiledonar	0a	0a	62,5bc	1,5ab
BAP1 apical	0a	60,0f	90,0gh	1,56ab
BAP1 foliar	20,0de	70,0g	90,0gh	4,33e
BAP1 cotiledonar	10,0c	80,0h	92,5h	3,40d
BAP2 apical	10,0c	90,0i	100i	1,10a
BAP2 foliar	20,0de	67,5g	87,5fgh	4,25e
BAP2 cotiledonar	50,0fg	50,0e	87,5fgh	3,50de
BAP4 apical	7,5bc	90,0i	87,5fgh	1,5ab
BAP4 foliar	7,5bc	87,5i	87,5fgh	3,00d
BAP4 cotiledonar	20,0de	50,0e	80def	2,88cd
CIN1 apical	27,5e	30,0d	72,5cd	1,00a
CIN1 foliar	20,0de	22,5c	42,5a	1,38ab
CIN1 cotiledonar	25,0de	32,5d	55,0b	1,00a
CIN2 apical	5,0b	90,0i	92,5h	1,20ab
CIN2 foliar	22,5de	47,5e	77,5de	2,13bc
CIN2 cotiledonar	55,0gh	32,5d	85efg	1,00a
CIN4 apical	17,5d	62,5f	90gh	1,13a
CIN4 foliar	62,5h	15,0b	77,5de	1,88ab
CIN4 cotiledonar	42,5f	32,5d	75d	1,56ab

\*Houve interação entre os fatores. Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Duncan.



**Apêndice D.** Respostas morfogênicas obtidas a partir da cultura de raízes excisadas de plantas *in vitro* com 2 meses de idade, avaliadas após 60 dias de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de BAP e CIN.

<b>Fatores</b>	<b>Níveis</b>	<b>Cresceu (%)*</b>	<b>Calos (%)*</b>	<b>Explante oxidado (%)*</b>
<b>Regulador de Crescimento</b>	BAP	17,5a	41,25b	35,63a
	CIN	33,75b	19,38a	40,00a
<b>Concentração (µM)</b>	0	30,00b	25,00ab	40,00a
	1	17,50a	37,50ab	32,50a
	2	42,50b	11,25a	43,75a
	4	12,50a	47,50b	35,00a

**Interação tipo de regulador de crescimento x concentração**

controle	30c	25b	40bc
BAP 1	5a	75d	17,5a
BAP 2	20bc	20b	55c
BAP 4	15b	45c	30ab
CIN 1	30c	0a	47,5bc
CIN 2	65d	2,5a	55abc
CIN 4	10b	50c	40bc

\*Houve interação entre os fatores tipo de regulador de crescimento e concentração. Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

**Apêndice E.** Efeito da idade do explante e da concentração de BAP no comprimento do broto originados da cultura *in vitro* de segmentos nodais apicais, de plantas *in vitro* de *Tabebuia heptaphylla* com 2 e 8 meses de idade. Média de 10 repetições.

<b>Fatores</b>	<b>Concentração</b>	<b>Comprimento do broto (mm)*</b>
<b>Idade da planta</b>	2 meses	12,31a
	8 meses	12,44a
<b>Concentração de BAP (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0	8,07a
	1,11	17,11b
	2,22	11,94ab
<b>Interação: Idade do explante x Concentração de BAP</b>		
	2 meses BAP0	3,71a
	2 meses BAP 1,11	21,13c
	2 meses BAP 2,22	12,10ab
	8 meses BAP 0	12,43ab
	8 meses BAP 1,11	13,10bc
	8 meses BAP 2,22	11,78ab

\* Interação significativa. Valores da mesma coluna, seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

**Apêndice F.** Respostas morfogênicas obtidas a partir da cultura de explantes de segmentos caulinares contendo os nós apicais ou foliares, durante a primeira, segunda e terceira subcultura.

<b>Fatores</b>	<b>Níveis</b>	<b>Expansão do explante (%)**</b>	<b>Formação Calos (%)**</b>	<b>Formação Brotos (%)**</b>	<b>Oxidação (%)**</b>	<b>Sem resposta (%)**</b>
<b>Número de subcultura*</b>	1	13,75b	77,50b	95,00b	5,00b	0a
	2	7,50b	52,50a	60,00a	23,75a	13,75b
	3	0a	37,50a	52,50a	15,00a	23,75c
<b>Explante</b>	Apical	4,17a	59,17a	61,67a	17,50a	15,00a
	Foliar	10,00a	52,50a	76,67a	11,67a	10,00a

**Interação: Número de subcultura x Tipo de explante**

Apical 1	5,00ab	92,50d	97,50d	2,50a	0a
Foliar 1	22,50c	62,50c	92,50c	7,50b	0a
Apical 2	7,50b	37,50ab	50,00a	30,00d	17,5c
Foliar 2	7,50b	67,50c	70,00b	17,50cd	10,00b
Apical 3	0a	47,50b	37,50a	20,00cd	27,50d
Foliar 3	0a	27,50a	67,50b	10,00	20,00c

\* O intervalo entre as subculturas foi de 60 dias.

\*\* Houve interação significativa entre o número de subcultura e o tipo de explante. Média de 4 repetições com 10 explantes cada. Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

**Apêndice G.** Massa da matéria fresca (mg) total e dos calos, número de brotos por explantes e comprimento do maior broto, obtidos a partir da cultura de explantes de segmentos caulinares contendo os nós apicais ou foliares, da primeira, segunda e terceira subculturas.

<b>Fatores</b>	<b>Níveis</b>	<b>Massa Fresca total (mg)**</b>	<b>Massa Fresca dos Calos (mg)**</b>	<b>Número de brotos por explante**</b>	<b>Comprimento do maior broto **</b>
<b>Número de subcultura*</b>	1	547,88c	420,46b	2,25b	19,33b
	2	310,96b	275,29b	1,79ab	8,00a
	3	87,83a	68,63a	1,30a	6,91a
<b>Explante</b>	Apical	339,94a	292,67a	1,14a	13,60a
	Foliar	291,17a	218,36a	2,42b	9,42a

**Interação: Número de subcultura x Tipo de explante**

Apical 1	711,67c	581,00c	1,42a	25,50c
Foliar 1	384,08b	259,92ab	3,08b	13,17b
Apical 2	241,17ab	224,67ab	1,00a	9,08ab
Foliar 2	380,75b	313,25b	2,58b	6,92ab
Apical 3	67,00a	55,33a	1,00a	5,55a
Foliar 3	108,67a	81,92a	1,58a	8,17ab

\* O intervalo entre as subculturas foi de 60 dias.

\*\* Houve interação significativa entre o número de subcultura e o tipo de explante. Médias de 4 repetições com 10 explantes cada. Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

**Apêndice H.** Efeito de BAP em diferentes concentrações, após 60 dias, na morfogênese de cotilédones inteiros ou segmentos de cotilédones excisados de plantas in vitro com 2 meses de idade.

<b>Fatores</b>	<b>Níveis</b>	<b>Explantes que sofreram expansão (%)*</b>
<b>Tipo de explante</b>	Cotilédone inteiro	57,94b
	Porção proximal	37,78a
	Porção distal	39,30a
<b>Concentração de BAP (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0	39,53a
	1,11	48,41a
	2,22	47,43a
	4,44	44,67a

**Interação: Tipo de explante x Concentração de BAP**

Inteiro 0	72,50e
Inteiro 1,11	72,50e
Inteiro 2,22	62,50de
Inteiro 4,44	77,50e
Proximal 0	20,00a
Proximal 1,11	42,50bc
Proximal 2,22	50,00cd
Proximal 4,44	40,00bc
Distal 0	30,00ab
Distal 1,11	52,50cd
Distal 2,22	50,00cd
Distal 4,44	30,00ab

\*Houve interação entre o tipo de explante e a concentração de BAP. Médias de 4 repetições com 10 explantes cada. Valores da mesma coluna seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Duncan.

**Apêndice I.** Germinação máxima (%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes armazenadas em geladeira por 22, 26, 105 e 120 semanas, criopreservadas (+NL) e não criopreservadas (-NL) por 60 minutos.

<b>Fatores</b>	<b>Níveis</b>	<b>Germinação Máxima (%)*</b>	<b>IVG*</b>
<b>Tempo de armazenamento (semanas)</b>	22	63,60b	3,79c
	26	69,50b	3,24b
	105	44,00a	1,81a
	120	37,60a	1,54a
<b>Processo de conservação</b>	+NL	50,65a	2,73a
	-NL	51,70a	2,47a
<b>Interação: Tempo de armazenamento x Processo de conservação</b>			
	+NL 22 semanas	57,6c	3,83d
	-NL 22 semanas	69,6d	3,75cd
	+NL 26 semanas	57c	3,28cd
	-NL 26 semanas	62cd	3,20c
	+NL 105 semanas	45,6b	1,99b
	-NL 105 semanas	42,4b	1,63ab
	+NL 120 semanas	42,4b	1,80ab
	-NL 120 semanas	32,8a	1,28a

\*Interação significativa entre o tempo de armazenamento e o processo de conservação. Média de 5 repetições com 25 sementes cada. Valores da mesma coluna, seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste Duncan ao nível de 5%

## Anexo

**Anexo A.** Dados meteorológicos do município de Florianópolis- SC, referentes ao período de maio a outubro de 2004 e 2005, com médias diárias de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa do ar (%). Fonte: Epagri/INMET, 2005.



Empresa de Pesquisa  
Agropecuária e  
Extensão

Estação: São José – SC  
(Grande Florianópolis)

Latitude: 27°35`S

Longitude: 48°34` Altitude: 2 metros

Fonte: Epagri/ INMET

Data	Tp_media_diária	Md_UR%	Data	Tp_media_diária	Md_UR%
			02/06/04	17,3	92
			03/06/04	17,6	80
			04/06/04	17,9	80
			05/06/04	16	76
			06/06/04	16,2	73
			07/06/04	16,7	81
			08/06/04	17,2	76
			09/06/04	17,6	79
			10/06/04	18,1	91
			11/06/04	17,5	93
			12/06/04	12,3	72
			13/06/04	9,7	62
			14/06/04	10,7	76
			15/06/04	13,7	68
			16/06/04	16,6	77
			17/06/04	19,6	75
			18/06/04	18,1	84
			19/06/04	18,4	80
			20/06/04	19,8	79
			21/06/04	19,2	84
			22/06/04	18,6	82
			23/06/04	20,1	77
			24/06/04	18,9	90
			25/06/04	19,3	86
			26/06/04	19,6	87
			27/06/04	21,1	84
			28/06/04	20,1	86
			29/06/04	21,5	81
			30/06/04	21	83
			01/07/04	20,8	86
			02/07/04	21	78
			03/07/04	21,6	81
			04/07/04	16	74
			05/07/04	14,9	83
			06/07/04	15,5	75
			07/07/04	18,3	78
			08/07/04	16,3	87
			09/07/04	14,1	82
			10/07/04	14,8	80
			11/07/04	9,9	59
			12/07/04	13,1	72
			13/07/04	17,7	81
			14/07/04	20,5	78
01/05/04	18,8	92			
02/05/04	20,5	81			
03/05/04	21,8	85			
04/05/04	20,2	92			
05/05/04	18,8	95			
06/05/04	20,2	90			
07/05/04	18,6	95			
08/05/04	19,3	71			
09/05/04	19,4	71			
10/05/04	18,2	76			
11/05/04	18,1	75			
12/05/04	18,1	85			
13/05/04	18,6	90			
14/05/04	19,1	78			
15/05/04	17,6	59			
16/05/04	16,2	69			
17/05/04	17,3	72			
18/05/04	17	68			
19/05/04	17,5	69			
20/05/04	17,5	74			
21/05/04	16,2	79			
22/05/04	17,6	93			
23/05/04	18,9	96			
24/05/04	19,5	89			
25/05/04	19,2	87			
26/05/04	17,3	55			
27/05/04	14,8	67			
28/05/04	13,1	71			
29/05/04	14,9	77			
30/05/04	15,7	80			
31/05/04	17,1	77			

Data	Tp_media_diária	Md_UR%	Data	Tp_media_diária	Md_UR%
16/07/04	15,3	87	04/09/04	19	77
17/07/04	12,7	74	05/09/04	21,4	80
18/07/04	13,2	78	06/09/04	20,8	83
19/07/04	14,3	91	07/09/04	21,5	75
20/07/04	15,2	80	08/09/04	21,4	83
21/07/04	14,8	78	09/09/04	20,8	84
22/07/04	15,2	80	10/09/04	20,4	87
23/07/04	15,2	82	11/09/04	16,6	76
24/07/04	15,7	83	12/09/04	15	86
25/07/04	16,6	86	13/09/04	18,5	87
26/07/04	16,8	72	14/09/04	18,7	89
27/07/04	17,3	66	15/09/04	17,7	73
28/07/04	18,6	74	16/09/04	16,7	77
29/07/04	18,2	83	17/09/04	18,9	74
30/07/04	16,7	84	18/09/04	21	84
31/07/04	14,8	68	19/09/04	22,5	61
01/08/04	14,2	73	20/09/04	22,4	78
02/08/04	15,1	77	21/09/04	21,7	79
03/08/04	18,1	74	22/09/04	20,9	89
04/08/04	20,6	80	23/09/04	18	88
05/08/04	20	83	24/09/04	19,4	91
06/08/04	19,4	84	25/09/04	20,8	81
07/08/04	15,1	84	26/09/04	22,3	83
08/08/04	11	57	27/09/04	21,6	91
09/08/04	14	75	28/09/04	21,1	91
10/08/04	14,8	73	29/09/04	19,1	60
11/08/04	15,5	78	30/09/04	17	59
12/08/04	15,3	78	01/10/04	19,5	68
13/08/04	16,5	76	02/10/04	20,6	74
14/08/04	18,2	78	03/10/04	18,7	78
15/08/04	19,7	81	04/10/04	18,6	79
16/08/04	19,8	79	05/10/04	18,3	66
17/08/04	19,3	80	06/10/04	17	60
18/08/04	18,6	85	07/10/04	17,7	64
19/08/04	19,7	79	08/10/04	18,2	68
20/08/04	20,1	78	09/10/04	19,7	71
21/08/04	18,9	87	10/10/04	19,8	91
22/08/04	15,5	78	11/10/04	20	76
23/08/04	15,3	84	12/10/04	21	79
24/08/04	15,5	67	13/10/04	21	94
25/08/04	18,3	75	14/10/04	20,2	79
26/08/04	17,4	73	15/10/04	20,9	69
27/08/04	16,6	91	16/10/04	22,4	83
28/08/04	18,8	83	17/10/04	22,4	75
29/08/04	17,2	80	18/10/04	21	80
30/08/04	19,5	70	19/10/04	20,1	66
31/08/04	18,4	75	20/10/04	17,6	63
01/09/04	19,2	80	21/10/04	19,5	61
02/09/04	22,3	70	22/10/04	20,5	85



Data	Tp_media_diária	Md_UR%	Data	Tp_media_diária	Md_UR%
24/10/04	19,8	79	12/06/05	22,7	81
25/10/04	17,7	84	13/06/05	21,4	83
26/10/04	18,5	68	14/06/05	22,2	74
27/10/04	19,4	60	15/06/05	19,6	91
28/10/04	17,5	63	16/06/05	21,2	80
29/10/04	19,2	60	17/06/05	18,9	95
30/10/04	22,5	70	18/06/05	19,8	87
31/10/04	20,7	88	19/06/05	18,7	91
01/05/05	19,5	68	20/06/05	16,4	74
02/05/05	18,9	71	21/06/05	13,3	68
03/05/05	19,9	71	22/06/05	14,8	73
04/05/05	20,4	73	23/06/05	16,9	81
05/05/05	21,5	73	24/06/05		78
06/05/05	21,3	75	25/06/05		80
07/05/05	20,5	83	26/06/05	18,5	82
08/05/05	20,3	90	27/06/05	19,4	83
09/05/05	20,1	92	28/06/05	20	82
10/05/05	22,7	79	29/06/05	20,8	82
11/05/05	22,8	74	30/06/05	20,6	85
12/05/05	21,9	78	01/07/05	20,8	82
13/05/05	22,5	81	02/07/05	22,2	76
14/05/05	23,3	84	03/07/05	23,4	64
15/05/05	23,1	85	04/07/05	19,6	88
16/05/05	23	76	05/07/05	17,4	73
17/05/05	21,8	86	06/07/05	11,9	62
18/05/05	21	95	07/07/05	15,9	69
19/05/05	22,4	79	08/07/05	15,7	79
20/05/05	20,7	92	09/07/05	16	87
21/05/05	19,1	71	10/07/05	16,7	84
22/05/05	14,2	68	11/07/05	17,7	81
23/05/05	15,9	70	12/07/05	17,2	84
24/05/05	19	91	13/07/05	17,5	82
25/05/05	19,8	74	14/07/05	18,7	80
26/05/05	15	76	15/07/05	20,1	75
27/05/05	18,1	75	16/07/05	20,4	77
28/05/05	20,7	80	17/07/05	18,9	80
29/05/05	21,5	72	18/07/05	14,6	55
30/05/05	20,5	80	19/07/05	10,9	62
31/05/05	21	83	20/07/05	11,9	67
01/06/05	22,3	83	21/07/05	15,8	84
02/06/05	22,6	87	22/07/05	18,8	92
03/06/05	23,5	82	23/07/05	15,5	92
04/06/05	23,2	83	24/07/05	13,1	83
05/06/05	22,8	82	25/07/05	12,3	72
06/06/05	21,6	82	26/07/05	13	70
07/06/05	20,9	80	27/07/05	13,7	75
08/06/05	21	77	28/07/05	15,8	76
09/06/05	20,3	87	29/07/05	17,4	81
10/06/05	21,5	83	30/07/05	19,2	87

Data	Tp_media_diária	Md_UR%	Data	Tp_media_diária	Md_UR%
01/08/05	20,5	72	20/09/05	19,2	84
02/08/05	18,6	81	21/09/05	19,6	82
03/08/05	17,7	93	22/09/05	19	93
04/08/05	19,4	79	23/09/05	19,4	91
05/08/05	19,4	76	24/09/05	20,3	88
06/08/05	19,1	79	25/09/05	17,7	81
07/08/05	16,9	79	26/09/05	17,2	57
08/08/05	12,3	84	27/09/05	16,7	78
09/08/05	14,7	91	28/09/05	17,7	79
10/08/05	17	74	29/09/05	19,5	81
11/08/05	17,8	76	30/09/05	20,3	78
12/08/05	16,5	81	01/10/05	19,2	87
13/08/05	18,6	77	02/10/05	20,7	80
14/08/05	18,3	76	03/10/05	21,5	75
15/08/05	18,9	79	04/10/05	20,3	89
16/08/05	19,8	77	05/10/05	19,5	87
17/08/05	21,1	76	06/10/05	17,4	76
18/08/05	19,1	83	07/10/05	17,2	95
19/08/05	19,1	82	08/10/05	20,8	93
20/08/05	19	87	09/10/05	21	80
21/08/05	20	85	10/10/05	20,1	76
22/08/05	20,9	81	11/10/05	20,3	79
23/08/05	20,2	84	12/10/05	22,4	78
24/08/05	18,3	71	13/10/05	23,1	82
25/08/05	13,6	59	14/10/05	21,8	89
26/08/05	14,5	69	15/10/05	18,3	79
27/08/05	19	72	16/10/05	17,3	97
28/08/05	21,5	75	17/10/05	20	88
29/08/05	26,7	55	18/10/05	19,8	84
30/08/05	19,3	89	19/10/05	19,8	69
31/08/05	16,1	94	20/10/05	21,4	70
01/09/05	16,6	93	21/10/05	22,3	84
02/09/05	17	43	22/10/05	24,4	78
03/09/05	13,9	66	23/10/05	21,4	77
04/09/05	15,2	96	24/10/05	20,4	80
05/09/05	16,6	83	25/10/05	23,7	78
06/09/05	16,7	70	26/10/05	21,5	78
07/09/05	16,3	69	27/10/05	21,1	85
08/09/05	17,4	67	28/10/05	20,5	90
09/09/05	19,1	86	29/10/05	19,3	73
10/09/05	20,4	90	30/10/05	18,1	77
11/09/05	19,4	79	31/10/05	17,9	73
12/09/05	10,5	83			
13/09/05	11,7	75			
14/09/05	13,5	92			
15/09/05	17,5	85			
16/09/05	16,1	79			
17/09/05	15,9	89			
18/09/05	16,7	97			