

**GERMINAÇÃO, CULTIVO *in vitro* E TOLERÂNCIA
AO CONGELAMENTO DE SEMENTES DE ANGICO-
VERMELHO (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**

FERNANDA CARLOTA NERY

2008

FERNANDA CARLOTA NERY

**GERMINAÇÃO, CULTIVO *in vitro* E TOLERÂNCIA AO
CONGELAMENTO DE SEMENTES DE ANGICO-VERMELHO**
(Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan)

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

Orientador

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

Nery, Fernanda Carlota

Germinação, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) / Fernanda Carlota Nery. – Lavras : UFLA, 2008.
217 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.
Bibliografia.

1. *Anadenanthera colubrina*. 2. Angico. 3. Semente. 4. Cultura de tecidos. 5. Criopreservação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.973163

FERNANDA CARLOTA NERY

**GERMINAÇÃO, CULTIVO *in vitro* E TOLERÂNCIA AO
CONGELAMENTO DE SEMENTES DE ANGICO-VERMELHO**
(*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)

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

APROVADA em 29 de agosto de 2008.

Prof. Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL
Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Prof. José Márcio Rocha Faria, PhD	UFLA
Prof. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, PhD	UFLA

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

Orientador

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2008

A Deus,

A minha mãe, Jane,

A minha irmã gêmea, Marcela,

Aos meus avós, Etelvina (*in memoriam*) e
Geraldo Carlota (*in memoriam*).

Dedico

Agradecimentos

A Deus, por sempre me dar forças para vencer os obstáculos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, de mestrado e de doutorado, e ao CNPq e Fapemig, pelas bolsas de iniciação científica.

Ao meu orientador, Prof. Amauri Alves de Alvarenga, por toda atenção, apoio e amizade.

Aos membros da banca examinadora e aos membros do comitê de co-orientação, professores Renato Paiva, José Márcio Rocha Faria e Cristina Filomena Justo, pela valiosa ajuda e inestimável contribuição.

À Profa. Joelma Pereira, pela valiosa convivência e amizade durante toda a minha formação e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Setor de Sementes, por sempre estar de portas abertas ao conhecimento.

À grande amiga, Profa. Cristina Filomena Justo (UFMT), pela convivência, conselhos e valiosa ajuda na minha formação profissional.

Ao Prof. Hilton Morbeck de Oliveira (UFMT) e família, pela valiosa amizade e ajuda durante todo o mestrado e doutorado.

À Dra. Fernanda Soares (MAPA) e à Dra. Patrícia Guimarães, pela amizade incondicional.

Aos funcionários Joel, Odorêncio, Lena, Tanhan, Tina e Celen, por todo o auxílio.

Aos amigos e colegas da pós-graduação em Fisiologia Vegetal que me acompanharam no mestrado e no doutorado e que, mesmo distantes, são presença constante em minha vida.

A todos que, de alguma maneira contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui, seja com um sorriso, um incentivo ou simplesmente com a força positiva do pensamento em mim. Agradeço a todos vocês, com muito carinho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Importância e características da espécie.....	4
2.2 Aspectos fisiológicos da germinação de sementes.....	7
2.3 Cultivo de embriões <i>in vitro</i>	10
2.4 Criopreservação de sementes.....	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
CAPÍTULO II: ESTUDOS MORFOANATÔMICOS DE FRUTO E SEMENTE E ALGUNS ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan.....	34
1 RESUMO.....	35
2 ABSTRACT.....	36
3 INTRODUÇÃO.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Material vegetal.....	40
4.2 Caracterização morfológica de frutos e sementes.....	41
4.3 Teste histoquímico das sementes.....	41
4.4 Caracterização ultraestrutural do eixo embrionário.....	42
4.5 Composição química das sementes.....	43
4.6 Curva de embebição das sementes.....	46
4.7 Efeito da temperatura e luminosidade na germinação de sementes.....	47
4.8 Efeito do substrato na germinação de sementes.....	49
4.9 Caracterização morfológica das plântulas em diferentes substratos.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Morfologia e anatomia dos frutos e sementes.....	50
5.2 Composição química de sementes.....	57
5.3 Curva de embebição de sementes.....	63
5.4 Efeito da temperatura e luminosidade na germinação de sementes.....	66
5.5 Efeito do substrato na germinação de sementes.....	70
6 CONCLUSÕES.....	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

CAPÍTULO III: ASPECTOS DA GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DE EIXOS EMBRIONÁRIOS, INDUÇÃO DE BROTAÇÕES E CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan.....	87
1 RESUMO.....	88
2 ABSTRACT.....	89
3 INTRODUÇÃO.....	90
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	93
4.1 Material vegetal.....	93
4.2 Efeito do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaOCl) e a drágeas de Paraformaldeído na desinfestação de eixos embrionários.....	93
4.3 Germinação <i>in vitro</i> de eixos embrionários.....	95
4.3.1 Efeito de GA ₃ e meios de cultura.....	95
4.3.2 Efeito de BAP e meios de cultura.....	99
4.4 Efeito do BAP e ANA na indução de brotações.....	102
4.5 Efeito do 2,4-D na indução de calos em diferentes explantes.....	105
4.6 Efeito do AIB e da caseína hidrolisada no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	106
4.7 Aclimatização de plântulas de <i>A. colubrina</i>	107
4.8 Anatomia foliar em plântulas <i>in vitro</i>	107
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
5.1 Efeito do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaOCl) e a drágeas de Paraformaldeído na desinfestação de eixos embrionários.....	108
5.2 Germinação <i>in vitro</i> de eixos embrionários.....	114
5.2.1 Efeito de GA ₃ e meios de cultura.....	114
5.2.2 Efeito de BAP e meios de cultura.....	124
5.3 Efeito do BAP e ANA na indução de brotações.....	132
5.3.1 Comprimento da maior brotação.....	132
5.3.2 Número de brotações por explante.....	134
5.3.3 Número de gemas por explante.....	137
5.3.4 Formação de calos na base dos explantes.....	139
5.4 Efeito do 2,4-D na indução de calos em diferentes explantes.....	141
5.5 Efeito do AIB e caseína hidrolisada no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	147
5.6 Aclimatização de plântulas <i>in vitro</i> de <i>A. colubrina</i>	149
5.7 Anatomia foliar <i>in vitro</i>	150
6 CONCLUSÕES.....	152
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153
CAPÍTULO IV: TOLERÂNCIA AO CONGELAMENTO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan.....	159
1 RESUMO.....	160
2 ABSTRACT.....	161

3 INTRODUÇÃO.....	162
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	166
4.1 Material vegetal.....	166
4.2 Armazenamento das sementes em câmara fria e em temperaturas inferiores a zero.....	167
4.3 Armazenamento de eixos embrionários em temperaturas inferiores a zero.....	168
4.4 Quantificação e integridade do DNA nuclear.....	170
4.5 Avaliação ultraestrutural de eixos embrionários.....	171
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	173
5.1 Armazenamento das sementes em câmara fria.....	173
5.2 Armazenamento das sementes em temperaturas inferiores a zero.....	175
5.3 Armazenamento de eixos embrionários em temperaturas inferiores a zero.....	178
5.4 Quantificação e integridade do DNA nuclear.....	184
5.5 Avaliação ultraestrutural de eixos embrionários criopreservados.....	187
6 CONCLUSÕES.....	190
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	190
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	199
ANEXOS A.....	200
ANEXOS B.....	213

RESUMO

NERY, Fernanda Carlota. **Germinação, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. 2008. 217 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, angico-vermelho, é uma *Mimosaceae*, de porte arbóreo, utilizada na arborização de pastos, madeira, carvão e em curtumes, devido ao alto teor de tanino de sua casca. Os estudos de germinação e as técnicas de propagação de sementes de espécie nativas florestais assumem papel relevante nas pesquisas científicas, objetivando a preservação e a utilização das plantas potencialmente econômicas e de interesse diversificado. As técnicas de criopreservação têm sido utilizadas na conservação a longo prazo de sementes dessas espécies em bancos de germoplasma. Objetivou-se estudar os aspectos morfoanatômicos e fisiológicos da germinação de sementes, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de eixos embrionários de *A. colubrina*. Concluiu-se que a anatomia seminal de *A. colubrina* é típica das leguminosas, especialmente considerando-se a subfamília *Mimosoideae*. O número de sementes por fruto é, em média, de 10 e o peso de mil sementes de 118 g. A composição química das sementes se caracteriza pela presença de elevados teores de proteína, seguidos de extrato etéreo e baixo conteúdo de amido. As sementes não apresentam dormência tegumentar e a maior porcentagem de germinação ocorre a 30°C, 15°C-25°C e 20°C-30°C, sendo as sementes indiferentes à luz. Os substratos areia e Plantmax® são eficientes na avaliação do desenvolvimento de plântulas. O uso de paraformaldeído por 120 minutos é eficiente na desinfestação de eixos embrionários. Todos os meios de cultura testados são eficientes para a germinação *in vitro* de eixos embrionários e a formação de plântulas normais. No entanto, é observada baixa taxa de sobrevivência *ex vitro*. O uso de BAP promove resposta eficiente na indução de brotações em segmentos nodais. O AIB e a caseína hidrolisada, nas concentrações testadas, não induzem a rizogênese em brotações. Na ausência de 2,4-D, a calogênese é ausente, comprovando a necessidade da adição do mesmo no meio de cultura. Segmentos caulinares, foliares e embrionários são explantes ideais para a indução de calogênese. Os eixos embrionários de *A. colubrina* apresentam comportamento ortodoxo quanto à tolerância ao congelamento, podendo ser conservados em temperaturas inferiores a zero, por longos períodos.

* Comitê Orientador: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (orientador), Renato Paiva, PhD – UFLA, José Márcio Rocha Faria, PhD – UFLA, Dra. Cristina Filomena Justo – UFMT (co-orientadores).

ABSTRACT

NERY, Fernanda Carlota. **Germination, *in vitro* cultivation and freezing tolerance of red angico seeds** (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan). 2008. 217 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

The species *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, red angico, is a *Mimosaceae*, of tree port, used in the tree planting of pastures, wood, coal and tannery, because of its high content of tannin in its bark. The seeds germination studies and propagation techniques of native forest species have a relevant role in scientific researches, aiming to preserve and use these plants potentially economic and with diverse interests. The cryopreservation techniques have been used to the long-term preservation of seeds of these species in germoplasm banks. It was aimed the study of the morphological anatomical and physiological aspects of the seeds germination, the *in vitro* cultivation and the freezing tolerance of *A. colubrina* embryonic axes. It was concluded that the seminal anatomy of *A. colubrina* is typical of legumes, mainly considering the subfamily *Mimosoideae*. The number of seeds in each fruit is in average 10, and the weight of one thousand seeds is 118 g. The chemical composition of the seeds is characterized by the presence of high contents of proteins followed by ether extract, and a low content of starch. The seeds did not presented tegumentary dormancy and the highest germination percentage was verified at 30°C, 15°C-25°C and 20°C-30°C, being the seeds indifferent to light. The substrates sand and Plantmax® are effective in assessing the seedlings development. The use of Paraformaldehyde for 120 minutes is effective to the desinfestation of embryonic axes. All the culture media are effective to the *in vitro* germination of embryonic axes and to the formation of normal seedlings, however, it is observed a low *ex vitro* surviving rate. The use of BAP promotes efficient response of shoots induction in nodal segments. The IBA and hydrolyzed casein in the concentrations tested, did not induced the shoots rooting. In the absence of 2,4-D, it is not observed the callus formation, confirming the necessity of its use in the culture medium. Stem segments, leaves and embryonic explants are ideal to the callus induction. The embryonic axes of *A. colubrina* presents an orthodox behaviour to freezing, and can be preserved under temperatures below zero for long periods.

* Adviser Comitee: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Adviser), Renato Paiva, PhD – UFLA, José Márcio Rocha Faria, PhD – UFLA, Dr^a. Cristina Filomena Justo – UFMT (Co-advisers).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, com uma extensa superfície de terras contínuas, dispõe de diferentes ecossistemas, e é considerado um dos países de maior diversidade biológica do globo (The United Nations Environment Programme-UNEP, 1992; Brasil, 2002). Em geral, os recursos naturais do país têm sido pouco estudados, uma situação indicativa da necessidade de pesquisas que visem o melhor conhecimento e uso desta diversidade biológica e, conseqüentemente, o estabelecimento de estratégias de conservação. Isto se faz necessário em função da destruição dos habitats pelo homem por meio das queimadas, da poluição das águas, da expansão das áreas agrícolas e das áreas urbanas (Dias, 1994; Wetzel et al., 2003).

A conservação da biodiversidade como atividade científica vem sendo realizada há menos de 40 anos, para reduzir a erosão genética e como reserva de germoplasma, visando o melhoramento da produtividade agrícola (Internacional Board for Plant Genetic Resources-IBPGR, 1993) e o desenvolvimento de técnicas para a conservação de material biológico com a máxima variabilidade genética possível (Bajaj, 1995).

Dois tipos de conservação que se complementam são reconhecidos e adotados pela Convenção da Diversidade Biológica (UNEP, 1992): a conservação *in situ*, na qual são conservadas as populações de espécies nativas em seu ambiente natural, e a conservação *ex situ*, na qual é conservada a variação genética das espécies fora do seu habitat. A conservação *ex situ*, realizada a curto, médio e longo prazo, é efetuada por meio de coleções de sementes, propágulos, meristemas e plantas, em câmaras frias, criotanques ou a campo, de acordo com a característica da espécie.

A crioconservação tem sido utilizada como um método alternativo ao banco de germoplasma tradicional, uma vez que a conservação das sementes

abaixo de -130°C permite que seu metabolismo seja paralisado, impedindo sua deterioração (Benson et al., 1998). Na afirmação de Villamil (1997), a crioconservação tem se mostrado um método eficiente, prático e de baixo custo na preservação de recursos fitogenéticos, além de manter a semente viável por tempo considerado indeterminado.

O êxito de um bom protocolo de criopreservação está baseado em seis pontos críticos, segundo Withers (1985): **pré-congelamento**, que se inicia vários dias antes do congelamento e consiste em manipular as condições de cultivo *in vitro* para aumentar a tolerância ao congelamento, adicionando-se ao meio de cultura compostos com atividade osmorreguladora ou outros aditivos; **crioproteção**, que consiste na adoção de alguns cuidados que permitam que a célula suporte o congelamento, cuidados esses associados, principalmente, à toxicidade dos crioprotetores; **resfriamento**, que consiste na diminuição da temperatura que prepara o explante para o congelamento; **conservação**, a qual se dá em nitrogênio líquido a -196°C , na fase líquida ou a -150°C , na fase de vapor; **descongelamento**, que é a fase de recuperação do material estocado e **crecimento de recuperação**, que serve para avaliar a viabilidade do material após o período de congelamento e conservação.

De acordo com a Internacional Board for Plant Genetic Resources (IBPGR, 1993), a crioconservação é uma tecnologia especialmente indicada para as espécies de difícil propagação vegetativa, espécies com sementes recalcitrantes, germoplasma raro ou, mesmo, espécies ameaçadas de extinção, em virtude da exploração desordenada e falta de práticas adequadas de manejo ou de uma política de reflorestamento (Diniz et al., 2003; Paes et al., 2006).

Diante do exposto, objetivou-se estudar alguns aspectos da germinação das sementes, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de eixos embrionários de *A. colubrina*, visando à sua preservação a médio e longo prazo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância e características da espécie

A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan é conhecida como angico-vermelho, com sinonímia botânica de *Piptadenia macrocarpa* Benth e *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenam, segundo, respectivamente, Rizzini (1978) e Carvalho (1994). É a espécie de angico com a maior distribuição geográfica; ocorre desde o Sul da Bolívia até o Norte da Argentina. No Brasil, ocorre em todas as regiões, com exceção da região Sul, o que faz com que seja utilizada em programas de reflorestamento e exploração de madeira (Carvalho, 1994). *A. colubrina* pertence à família *Fabaceae*, subfamília *Mimosoideae*, sendo conhecida popularmente como angico, angico-branco-liso, angico-cambuí, angico-côco, angico-escuro, angico-liso, angico-vermelho, aperta-ruão, cambuí, cambuí-angico, cambuí-vermelho, cauvi, curupai, jurema-preta e monjoleiro. A espécie ocorre principalmente em floresta estacional semidecídua (Lorenzi, 2000; Carvalho, 1994).

É uma planta decídua, heliófita, pioneira, característica da mata secundária de regiões acima de 400 m de altitude. Anualmente, as plantas produzem grande quantidade de sementes viáveis (Lorenzi, 2000).

A árvore possui caule mais ou menos tortuoso e mediano, de casca grossa, muito rugosa, fendida e avermelhada. Suas folhas são compostas bipinadas. As flores são alvas, dispostas em capítulos globosos, axilares, e suas vagens são achatadas e grandes. Pode chegar a até 32 m de altura (Braga, 1976). Sua propagação ocorre por sementes, apresentando também rebrotação de tocos. A maioria de suas sementes é viável, com ausência de dormência, sendo a germinação rápida e alta em uma ampla faixa de temperatura (Maia, 2004).

As agressões ao meio ambiente, provocadas, sobretudo, por fatores antrópicos, levam à diminuição da população de árvores do gênero *Anadenanthera* (Melo et al., 2005).

Segundo Lorenzi (2002), *A. falcata* (Benth.) Speg. e *A. macrocarpa* (Benth.) Brenan produzem, anualmente, grande quantidade de sementes viáveis. Todavia, *A. colubrina* var. *cebil* apresentou florescimento irregular no Ceará (Carvalho, 2003), enquanto, em Pernambuco, essa espécie não floresceu durante um ano, mas floresceu e frutificou no ano seguinte (Machado et al., 1997).

Cada espécie apresenta um padrão de comportamento quanto ao florescimento, polinização e frutificação; alterações periódicas ou duradouras nesse padrão afetam a produção de sementes. A baixa eficiência da polinização, causada pela pequena produção de flores e pela ausência de polinizadores, pode aumentar a endogamia e, segundo Piña Rodrigues & Piratelli (1993), pode ter reflexo direto na produção qualitativa e quantitativa de sementes. Costa et al. (1992) verificaram que *Anadenanthera falcata* Benth. é preferencialmente alógama, sendo a polinização cruzada favorecida pelo alto grau de auto-incompatibilidade genética, associado à defasagem no período de receptividade dos órgãos masculino e feminino. É provável que *A. colubrina* também seja alógama. As duas espécies, *A. falcata* e *A. colubrina*, são hermafroditas e polinizadas por vários insetos pequenos, principalmente abelhas (Carvalho, 2003).

As alterações climáticas ocorridas nos últimos anos podem ter afetado os eventos biológicos relativos à produção de sementes de angico e o comportamento dos polinizadores (Marques, 2007). Portanto, são necessários estudos da conservação de sementes dessa espécie, durante um período mais prolongado.

Leguminosas como o angico formam simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Essa simbiose converte e transfere esse nutriente para a planta, em

formas assimiláveis, mediante a ação do rizóbio, num processo denominado fixação biológica do nitrogênio (Franco, 1996). Plantas dessa espécie podem crescer mais rapidamente, além de enriquecer o solo com nitrogênio (Patreze, 2003). Esses efeitos benéficos promovidos pelo crescimento de plantas leguminosas no solo têm sido observados por séculos (Pereira, 2006).

Além das características descritas por Carvalho (1994) e Lorenzi (1998), a distribuição nacional de *A. colubrina* e o seu rápido crescimento têm ampliado sua utilização, sendo empregada em programas de reflorestamento. Observações feitas a campo têm demonstrado que o seu bom desempenho pode ser devido ao seu potencial alelopático que atuaria inibindo o crescimento e o desenvolvimento de outras plantas, fazendo com que o angico tenha sucesso em testes de competição (Abreu, 1997).

Até o momento, as indicações das potencialidades alelopáticas do angico-vermelho são indiretas. Uma delas é a presença de 13,6% a 20% de tanino em seus frutos e na casca do caule (Carvalho, 1994). A outra é a existência de alta concentração do alcalóide bufotenina nas sementes e nas partes vegetativas, segundo Fellows & Bell (1971), podendo ter um papel importante para a sobrevivência da planta, promovendo, provavelmente, proteção contra animais ou insetos predadores.

Moretão (2004) destacou, ainda, que a espécie *Anadenanthera colubrina* é utilizada com fins medicinais, mais especificamente como imunomoduladora e antitumoral.

Na Figura 1 observa-se o aspecto geral da planta, bem como suas principais estruturas.

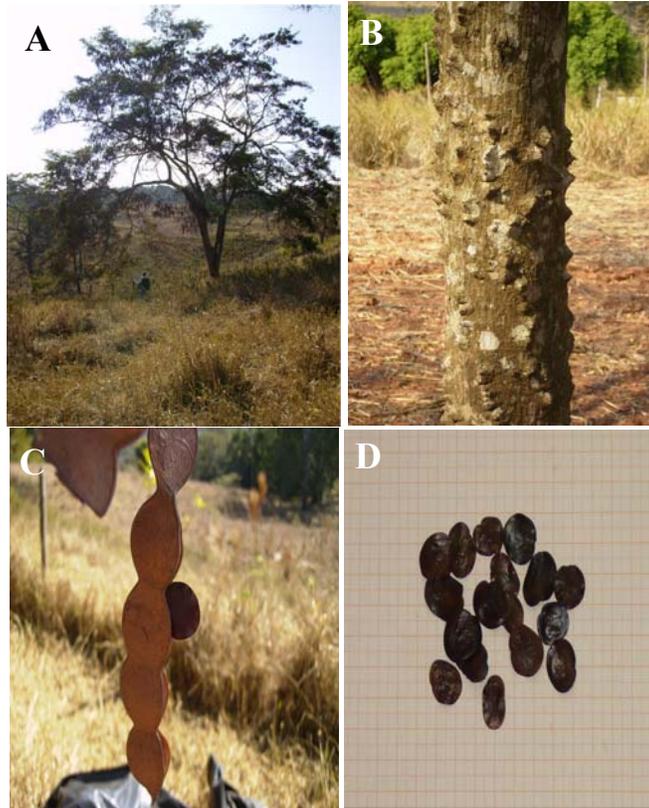


FIGURA 1. Aspecto geral da planta adulta (A), do tronco (B), do fruto (C) e de sementes (D) de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. UFLA, Lavras, MG, 2008. Autora: Fernanda Carlota Nery.

2.2 Aspectos fisiológicos da germinação de sementes

A propagação de um grande número de espécies florestais de importância social, econômica e cultural encontra sérias limitações, em razão do pouco conhecimento das características fisiológicas, morfológicas e ecológicas de suas sementes (Machado, 2002).

A germinação da semente é considerada como a retomada das atividades metabólicas do eixo embrionário, o qual se encontrava paralisado nas fases finais do processo de maturação; porém, quando estimulado por condições ambientais, desenvolve-se, ocorrendo, então, o rompimento do tegumento pela radícula (Bewley & Black, 1994). Essa é uma etapa crítica do biociclo vegetal pelo fato de o processo estar associado a vários fatores de natureza extrínseca e intrínseca, ou seja, a processos fisiometabólicos (Bewley & Black, 1994).

O processo germinativo tem início com a embebição de água pelos tecidos da semente, seguida da retomada das atividades metabólicas, sobretudo da síntese de novas enzimas e do aumento da atividade das hidrolases pré-existentes, visando à mobilização dos compostos de reserva para a retomada de crescimento do eixo embrionário (Bewley & Black, 1994).

Vários autores afirmam que a embebição representa o passo inicial da germinação e que este processo é caracterizado pela entrada de água na semente através do tegumento, promovendo a turgescência das células, aumentando a permeabilidade ao O₂, favorecendo o rompimento do tegumento e, conseqüentemente, facilitando a emergência das estruturas internas das sementes. A absorção de água pela semente é influenciada, dentre outros fatores, pela composição química da semente (as proteínas apresentam maior afeição por água que o amido, portanto, são hidrófilas, enquanto os lipídios são hidrófobos) e pela permeabilidade do tegumento à água (Carvalho & Nakagawa, 2000; Bewley & Black, 1994 e Marcos Filho, 2005).

O conhecimento das condições ideais para a germinação da semente de uma determinada espécie é importante, principalmente, pelas respostas diferenciadas que a semente pode expressar em função de diversos fatores, como viabilidade, dormência, condições de ambiente, envolvendo água, luz, temperatura, oxigênio e ausência de agentes patogênicos (Chachalis & Reddy,

2000; Simpson & Dean, 2002; Koger et al., 2004; Chen et al., 2005; Finch-Savage et al., 2006).

Além dos fatores bioquímicos, aspectos fisiológicos, como a temperatura e a sensibilidade à luz, dentre outros, exercem papel fundamental na germinação. Como em qualquer reação química, existe uma temperatura ótima na qual o processo germinativo se realiza mais rápida e eficientemente, variável entre as diferentes espécies (Bewley & Black, 1997).

Quanto ao comportamento germinativo de espécies sensíveis à luz, encontram-se sementes que germinam somente após rápida exposição à luz, outras que necessitam de período amplo de exposição, outras em que a germinação é desencadeada somente no escuro (Vidaver, 1980) e sementes indiferentes à luz (Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia, 1991).

Apesar do aumento considerável de conhecimentos relativos à análise de sementes de espécies florestais, gerado pelas pesquisas nas duas últimas décadas, a maioria delas carece ainda de subsídios básicos referentes às exigências quanto às condições ótimas de germinação (Varela et al., 2005).

Diferenças no vigor associadas com as características das sementes são, geralmente, atribuídas à composição química, principalmente com relação à quantidade de reservas ou à eficiência no metabolismo (Hampton, 1973). Quanto maior o teor de reservas das sementes, maior será o vigor das plântulas originadas. Assim, o suprimento de água durante o período de desenvolvimento da semente pode influenciar indiretamente seu vigor pelo efeito que exerce sobre sua composição química (Carvalho & Nakagawa, 2000).

É importante ressaltar que as sementes oleaginosas apresentam menor potencial de armazenamento que as amiláceas, devido à menor estabilidade química dos lipídios em relação ao amido. O teor elevado de proteínas também pode contribuir para a redução do potencial de armazenamento, devido à elevada afinidade dessa substância com a água (Marcos Filho, 2005).

2.3 Cultivo de embriões *in vitro*

A técnica de cultivo *in vitro* é uma alternativa para a propagação em diferentes circunstâncias, tais como a multiplicação de genótipos resistentes a doenças, mais produtivos, híbridos e organismos geneticamente modificados, entre outros (Redenbaugh, 1991).

O cultivo de embriões *in vitro* é uma técnica promissora para avançar nos conhecimentos de determinadas espécies, uma vez que, a partir dela, é possível reproduzir e estudar o desenvolvimento embrionário, a quebra da dormência e a produção de plântulas (Collins & Grosser, 1984; Hu & Ferreira, 1998). Além disso, acrescenta-se o fato de que tecidos embrionários são excelentes explantes, visando à propagação clonal *in vitro*, em virtude de sua natureza juvenil e alto potencial regenerativo (Pierik, 1990).

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de macro, micronutrientes e açúcares constituintes dos meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese, por meio de propriedades osmóticas (George, 1996). Os carboidratos desempenham importante papel na manutenção de uma osmolaridade adequada do meio de cultura, além de serem fontes de energia para os explantes. Em geral, quanto mais jovem for o embrião excisado, mais alta será a osmolaridade requerida do meio (George, 1996).

Embriões zigóticos ou cotilédones podem ser cultivados com sucesso para produzir plantas férteis (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1989), servindo como fonte de explantes para a propagação *in vitro* de diversas espécies florestais, tais como *Ilex* spp., *Larix* spp., *Pinus* spp., *Quercus* spp., *Santalus* spp., entre outras (Thorpe et al., 1991) e frutíferas, como *Garcinia mangostana* L. No entanto, os explantes mais comuns são segmentos nodais e ápices caulinares (Litz & Jaiswal, 1991).

O cultivo de embriões, assim como qualquer outra técnica de cultura de tecidos, exige cuidados fundamentais para o seu sucesso. A assepsia do material estudado deve ser rigorosa, de modo a impedir a proliferação de organismos que possam contaminar os explantes, tais como fungos e bactérias (Wareing et. al., 1970).

Na etapa de multiplicação *in vitro*, a capacidade dos explantes de sobreviverem, desenvolverem-se e multiplicarem-se é conseqüência de vários fatores, como o genético, o estado fisiológico, as concentrações endógenas de hormônios nos explantes e as condições ambientais de cultivo. Além disso, o uso de um meio de cultura apropriado para cada fase do cultivo é condição básica, devendo estes meios proporcionar os nutrientes necessários ao metabolismo das células vegetais em cultivo para o seu crescimento e a diferenciação dos tecidos (Kozay et al., 1997).

Os meios nutritivos atendem, como princípio, as exigências de uma planta completa (Caldas et al., 1998). A adição dos fitorreguladores ao meio tem a finalidade de prover possíveis carências endógenas, pois o explante encontra-se isolado das regiões produtoras de hormônios na planta matriz (Grattapaglia & Machado, 1990).

Em cultura de tecidos, as citocininas mais comumente usadas são cinetina (CIN), 6-benzilaminopurina (BAP), zeatina (ZEA), isopenteniladenina (2ip) e thidiazuron (TDZ) e as auxinas são ácido 3-indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Caldas et al., 1998). As mudanças nos nutrientes do meio, principalmente alterações envolvidas no balanço de auxina e citocinina, são essenciais para o desenvolvimento do embrião (Wareing et. al., 1970). A sacarose está presente como fonte de carbono para a glicólise e o ciclo de Krebs, pelo fato de o explante (embrião) não ser, ainda, um organismo suficientemente autotrófico (Cid, 2001).

O carvão ativado adsorve fitotoxinas produzidas pelo explante (Fridborg et al., 1978). Segundo Tilquin (1979), o carvão ativado no meio de cultivo estimula o enraizamento, reduzindo a quantidade de luz que chega à região de formação de raízes, promovendo o seu alongamento (Rajore & Batra, 2005).

A organogênese *in vitro* envolve uma variedade de seqüências complexas de desenvolvimento, resultantes da manipulação experimental de partes de uma planta, culminando na formação de primórdios de órgãos ou plantas inteiras (Hicks, 1980).

Quando a organogênese ocorre a partir de tecidos do explante ou de pequenas proliferações dos mesmos, ainda sobre o explante inicial, sem a formação do calo, denomina-se organogênese direta. A via indireta é caracterizada quando a organogênese ocorre a partir de calos isolados do explante inicial (Stirmart, 1986). A organogênese envolve a diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal. As brotações são induzidas em meio de cultura enriquecido com citocininas e enraizadas em um meio contendo auxina (Grattapaglia & Machado, 1990). Certas espécies enraízam com dificuldade, ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas. Por outro lado, para algumas espécies, dispensa-se o uso de auxinas no seu enraizamento (Rohr & Hanus, 1987).

A etapa que se segue ao enraizamento *in vitro* das plântulas é a aclimatização que normalmente ocorre em ambiente com alta luminosidade e umidade. A aclimatização envolve o transplantio da plântula da condição *in vitro* para a casa de vegetação o que, geralmente, é uma fase crítica e que pode ser fator limitante para o processo de micropropagação de algumas espécies (Torres et al., 1998). Vários fatores estão envolvidos na morte ou na sobrevivência das plântulas durante a aclimatização, tais como genótipo, estresse hídrico, alteração do metabolismo heterotrófico para autotrófico, infecção por patógenos e estresse pela alteração na radiação. O ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a

diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta (Debergh & Maene, 1981).

A desordem estrutural e funcional nas plântulas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores do meio de cultura. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas quando transferidas para condições *ex vitro* (Ziv, 1987). Pasqual et al. (1997) afirmam que, durante o processo de transferência para a condição *ex vitro*, a cutícula é freqüentemente menos desenvolvida em razão da umidade relativa no interior dos frascos ser alta. Como consequência, ocorre elevada perda de água durante o processo de aclimatização. As modificações manifestadas, principalmente nas folhas, afetam a fotossíntese e as trocas gasosas. O ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta (Debergh & Maene, 1984).

Poucos são os trabalhos que têm demonstrado o potencial e a viabilidade de regeneração *in vitro* de *A. colubrina* e sua sinónímia *Parapiptadenia rigida* (Nascimento, 2007a; Nascimento 2007b, Nascimento, 2008; Nepomuceno 2006). Mesmo com alguns avanços, há limitações ao processo de micropropagação da espécie que demande soluções para que a técnica possa ser aplicada comercialmente (Nepomuceno, 2006).

Uma das metodologias para a propagação *in vitro* mais aplicada é a calogênese. Calos são definidos como aglomerados de células parenquimáticas não organizadas, irregularmente diferenciados, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas. E podem se diferenciar em tecidos e órgãos (Torres et al., 1998).

Segundo Pierik (1990), o crescimento e o desenvolvimento dessas células podem ser influenciados pelo próprio material vegetal, pelo meio nutritivo, acrescido ou não de reguladores de crescimento e por fatores externos, como luz e temperatura. Esses fatores agem acelerando, retardando ou, mesmo,

inibindo a proliferação celular, conseqüentemente, a formação e o crescimento do calo.

Para a indução de calo, qualquer tecido pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência. Pierik (1990) comenta que explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados são mais apropriados para a cultura de tecidos por possuírem alta capacidade de regeneração.

De acordo com Vietez & San-José (1996), muitas vezes, é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calos. Essa indução é regulada pela interação e o balanço entre os reguladores sintéticos fornecidos e os hormônios produzidos internamente pelo explante.

O efeito produzido *in vitro* por um determinado regulador de crescimento depende do ambiente no qual o órgão ou tecido está sendo cultivado. Concentrações idênticas de um mesmo regulador, em dois meios de cultura diferentes entre si, podem ter efeitos distintos (Pasqual, 2001).

As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos, entretanto, seu efeito difere conforme a situação. Por isso, concentrações efetivas deste regulador precisam ser ajustadas de acordo com o genótipo da planta a ser cultivada e o tipo de tecido ou órgão (Pasqual, 2001).

2.4 Criopreservação de sementes

Para muitas espécies, a capacidade de armazenamento é ampliada, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição da temperatura do ambiente (Walters et al., 1998). Temperaturas baixas conservam melhor os componentes celulares, como as enzimas, permitindo a disponibilização de glicose para a respiração da semente, por meio da hidrólise

de sacarose ou outros oligossacarídeos, podendo ainda agir em enzimas sintetizadoras de outros componentes responsáveis pela integridade das membranas (Peterbauer & Richter, 2001). Contudo, há espécies que não toleram grande redução da temperatura, principalmente o congelamento (Chin et al., 1989). Nestas condições, a quantidade de água torna-se mais importante, pois a água contida nas sementes pode propiciar a formação de cristais de gelo, acarretando rupturas mecânicas na parede celular e no sistema de membranas, promovendo a desagregação celular e a conseqüente perda da viabilidade das sementes (Roberts 1973, Andrade & Pereira, 1997).

A criopreservação é a conservação de material biológico a temperaturas ultrabaixas, assegurando a conservação *ex situ* do material biológico por longos períodos, interrompendo o metabolismo celular. Por isso, a técnica é considerada promissora para a preservação a longo prazo do germoplasma de espécies vegetais (Carvalho & Vidal, 2003). Nesse sistema, os problemas que ocorrem durante o armazenamento convencional, tais como danos no DNA, requerimento de avaliações periódicas, controle da viabilidade, risco de perda por doenças e problemas ambientais, são reduzidos ou eliminados (Tarré et al., 2007).

A semente é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica. Na conservação de sementes, devem-se considerar as características fisiológicas que afetam a longevidade de cada espécie, quando submetida a baixos níveis de umidade e a temperaturas abaixo de zero (Tarré et al., 2007).

Segundo Roberts (1973), as sementes são classificadas em duas categorias: as que podem ser armazenadas por longos períodos com baixos teores de água, em baixas temperaturas e são denominadas ortodoxas, e as que não toleram o dessecamento e o armazenamento em baixas temperaturas, as recalcitrantes, as quais perdem sua viabilidade, mesmo quando armazenadas por curtos períodos. Uma terceira categoria foi proposta por Ellis et al. (1990), as

intermediárias, cuja definição está baseada na resposta de longevidade ao ambiente de armazenamento, as quais apresentam tendência para longevidade crescente, quanto menor o grau de umidade da semente no armazenamento (sob condição de ar seco). Mas, esta condição é invertida a um grau de umidade relativamente alto e, a partir desse ponto, a redução do grau de umidade implica em redução da longevidade.

Desde então, várias outras classificações foram sugeridas. A classificação de Bonner (1990) é considerada a mais adequada para as sementes de espécies florestais (Carvalho, 2000), compreendendo 4 grupos: 1) ortodoxas verdadeiras: sementes que toleram a secagem abaixo de 10% de umidade e, quando submetidas a temperaturas abaixo de zero, podem ser armazenadas por período relativamente longo, ou seja, durante 50 anos ou mais; 2) subortodoxas: são sementes que podem ser armazenadas sob as mesmas condições do grupo anterior, mas, no máximo, por 6 meses; 3) temperadas recalcitrantes: são sementes sensíveis à dessecação a baixos níveis de umidade, mas podem ser armazenadas por vários anos, em temperaturas próximas do congelamento e 4) tropicais recalcitrantes: são sementes que também devem ser armazenadas em condições de alta umidade relativa e com troca de gases, porém, apresentam maior sensibilidade a baixas temperaturas e à dessecação.

Stanwood (1981) dividiu as sementes em três classes, em relação à criopreservação (congelamento na temperatura de nitrogênio líquido), como uma alternativa para a preservação a longo prazo: ortodoxas resistentes ao congelamento (não danificadas pela secagem), ortodoxas sensíveis ao congelamento e recalcitrantes (danificadas pela secagem). Sementes de mais de 140 espécies foram congeladas e reaquecidas sem danos em sua viabilidade ou no desenvolvimento subsequente da planta.

A metodologia convencional de conservação dos recursos genéticos inclui a coleção de germoplasma sementes (4% a 7% de grau de umidade a -20°C),

exigindo espaço apropriado e avaliações periódicas da sua viabilidade ou, ainda, conservação em condições de campo, a qual se apresenta muito laboriosa e é constantemente exposta a estresses climáticos e biológicos, podendo levar à total perda da coleção de germoplasma (Vieira, 2000, Nóbrega et al, 2001, Santos et al., 2002, Lopes et al., 2004). Styles et al. (1982) salientaram as vantagens do armazenamento das sementes em nitrogênio líquido sobre os métodos convencionais: ausência do controle da temperatura e da umidade relativa, proteção contra pragas e doenças e preservação infinita com pouca ou nenhuma alteração genética.

A criopreservação dos eixos embrionários pode ser a metodologia mais apropriada para a conservação em longo prazo da diversidade genética de várias espécies, ocupando o mínimo de espaço em bancos de germoplasma (Stushoff & Seufferheld, 1995; Younge et al., 1997). Em adição, é possível eliminar a possível presença de microrganismos no armazenamento, os quais reduzem a germinação das sementes (Moshkin, 1986).

A técnica de criopreservação proporciona o potencial para uma preservação sem limites de tempo devido à redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração é paralisada. Os métodos tradicionais de conservação apenas adiam a deterioração por um período de tempo determinado e específico, de acordo com o material e a espécie em questão (Cunha, 1996). A criopreservação tem enorme potencial para garantir a conservação a longo prazo do germoplasma de espécies ortodoxas (Buzó et al., 2001).

A utilização do nitrogênio líquido como um meio de armazenamento pressupõe que as sementes sobrevivam à exposição sem sofrer danos maiores à sua viabilidade e, para isso, o grau de umidade da semente é, provavelmente, o fator crítico para o sucesso da criopreservação. Isso porque, se a umidade da

semente for muito alta, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e ou descongelamento (Cunha, 1996).

O uso de temperaturas ultrabaixas para a preservação de sementes é um método promissor, usado para conservar *ex situ* os recursos genéticos e conservar a diversidade genética de plantas. Prolongar o período de armazenagem de uma amostra de sementes, tanto quanto possível, mantendo-se um elevado percentual de germinação e vigor, são os objetivos da aplicabilidade da técnica. A perda da viabilidade da semente e a prematura detecção da deterioração são importantes aspectos fisiológicos a serem considerados no armazenamento. Sendo assim, o percentual de umidade da semente e a temperatura de armazenagem são fatores primários que podem ser manipulados e controlados para minimizar a deterioração das sementes preservadas a longo prazo (Buzó et al., 2001).

O grande desafio para a aplicação da técnica de criopreservação é realizar o congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular. Como consequência disso, as células entram em colapso (Buzó et al., 2001).

Evitar a formação destes cristais não é uma tarefa fácil porque os tecidos vegetais usados na criopreservação apresentam teores consideráveis de água. A formação extensiva de cristais de gelo intracelular irá ocorrer caso estes tecidos sejam congelados no estado hidratado. Dessa maneira, a água precisa ser previamente removida antes do congelamento, para evitar a injúria causada por estes cristais (Buzó et al., 2001).

Embora a criopreservação seja uma boa motivação para a formação de novos bancos de germoplasma, sobretudo em sementes cujos recursos genéticos devem ser preservados por longos períodos de tempo, muitos estudos ainda são

necessários com o objetivo de elaborar protocolos que viabilizem a sua real implantação. Essa demanda abre grandes perspectivas no campo da pesquisa, que deverão ser implementadas nesta próxima década (Mata, 2008).

A crioconservação, aliada à biotecnologia moderna, pode ser a solução chave para a sobrevivência dos recursos genéticos, por evitar a destruição alarmante de florestas e a erosão genética (Chin, 1994).

A conservação *in vitro*, seja em condições de crescimento lento ou criopreservação de eixos embrionários isolados, é o método mais promissor para a conservação a médio e a longo prazo, respectivamente. Tem sido relatado que eixos embrionários podem tolerar graus de umidade por volta de 12% e o subsequente congelamento em nitrogênio líquido. Eixos embrionários criopreservados são resgatados usando a cultura de tecidos, sendo que deles se originam plantas inteiras (Faiad et al., 2005).

Uma alternativa importante para a aplicação desta técnica é submeter o material a agentes crioprotetores, à base de dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etileno glicol, metanol e propileno glicol, entre outros (Salomão, 2002). Entretanto, esses crioprotetores podem ser tóxicos ou causar estresse osmótico, levando as células à morte ou modificando sua resposta morfogênética em cultura (Sakai, 1995). Portanto, utilizam-se, primeiramente, soluções com baixas concentrações para que haja entrada dos componentes permeáveis na célula e, em seguida, soluções concentradas de crioprotetores para promover a vitrificação. Após esse procedimento, os frascos são transferidos para o nitrogênio líquido. Os agentes crioprotetores penetrantes são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que o congelamento causa sobre a célula (Gonzalez, 2004).

Os crioprotetores agem reduzindo os danos celulares causados pelos efeitos da concentração dos sais no meio e possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo,

assim, a formação de cristais de gelo, não permitindo o aumento de tamanho desses cristais e diminuindo a concentração de soluto nos meios extra e intracelular. Estas ligações de hidrogênio também promovem a estabilização da estrutura quaternária das proteínas de membrana, preservando-as da desidratação. O uso de crioprotetores para os quais as células têm alta permeabilidade resulta em boa sobrevivência celular (Gonzalez, 2004).

Entretanto, o ideal é o desenvolvimento de protocolos de criopreservação que não dependam desses crioprotetores químicos para a sobrevivência do explante porque eles podem ser tóxicos para as células vegetais, complicam o procedimento de congelamento e, em muitos casos, não aumentam significativamente a porcentagem de regeneração (Arakawa et al., 1990; Santos, 2004).

Em um banco de germoplasma a baixas temperaturas, não só o processo de criopreservação deve ser levado em consideração como também o método de descongelamento, pois quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas. Portanto, o método de descongelamento à temperatura ambiente se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade do recongelamento durante este período. Dessa forma, tem se utilizado o descongelamento em banho-maria (temperatura de 37°C a 40°C) (Molina et al., 2006).

Os primeiros trabalhos sobre criopreservação de sementes de espécies florestais nativas do Brasil foram desenvolvidos por Medeiros & Cavallari (1992) e Medeiros et al. (1992), com *Astroniuim urundeuva* (aroeira). Estes autores relataram que as sementes mantiveram a capacidade germinativa durante todo o período de armazenamento de 150 dias e concluíram que a criopreservação é um método promissor para a conservação das sementes dessa espécie em bancos de germoplasma e que as sementes devem ser desidratadas a 6,0% de água.

Abreu & Medeiros (2005) equilibraram sementes de *Sebastiania commersoniana* (branquilha) com teor de água inicial de 8,5% e germinação inicial de 97% em cinco soluções salinas, a 20°C, e obtendo teores de água variando de 2,3% a 17,3%. Após a secagem, as sementes foram embaladas hermeticamente e armazenadas em câmara fria (5°C), freezer (-18°C) e nitrogênio líquido (-196°C). Nas avaliações realizadas até 180 dias de armazenamento nas diferentes temperaturas, o poder germinativo das sementes se manteve entre 92% e 95%.

Sementes de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan, com valores iniciais de 12,9% de água e 99% de germinação, foram acondicionadas em sacos de algodão e armazenadas em câmara com temperatura e umidade relativa controladas (não foram informados os valores), por Gomes et al. (1997). A cada seis meses foram avaliados o teor de água, a capacidade germinativa e o vigor das sementes. Após 12 meses, a capacidade germinativa foi reduzida para 68%. As sementes não germinaram após 20 meses de armazenamento. Mais recentemente, Dantas et al. (2005) acondicionaram sementes dessa mesma espécie em sacos plásticos e de papel e as armazenaram, por quatro meses, em câmara fria e em ambiente não controlado. Foram feitos testes de germinação em germinador, sobre papel Germitest® e semeadura em bandejas contendo areia lavada. Os autores não apresentaram nenhum resultado, nem valores iniciais da qualidade das sementes, mas relataram que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos tratamentos testados.

Com relação ao armazenamento em temperatura inferior a zero, Reis & Cunha (1997) estudaram o comportamento das sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico-vermelho), sob diversas condições de umidade e armazenamento, visando ao estabelecimento de métodos para a conservação de seu germoplasma. As sementes foram submetidas a quatro tratamentos: sementes com teor de água inicial de 5,6% (testemunha), sementes hidratadas a

8,3% de água, sementes hidratadas (8,3%) e desidratadas a 4,4% e sementes hidratadas (8,3%) e desidratadas a 3,5%. Após os tratamentos, as sementes foram acondicionadas em embalagem impermeável trifoliada (alumínio/papel/polietileno) e armazenadas, por 72 horas, em ambiente de laboratório (25±2°C), freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C). A germinabilidade foi mantida após todos os tratamentos, mas as sementes hidratadas apresentaram melhores resultados de vigor, principalmente em nitrogênio líquido. As autoras concluíram que as sementes dessa espécie apresentam comportamento ortodoxo, pela tolerância a baixo teor de água e ao congelamento. Resultados semelhantes foram descritos por Cerqueira et al. (2001), que relataram que sementes dessa mesma espécie, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a -14°C, contudo, após 10 meses de armazenamento, obtiveram 67% de germinação.

Entre as 39 espécies estudadas por Carvalho et al. (2006), para verificar a relação entre a classificação das espécies florestais quanto ao comportamento fisiológico durante o armazenamento e a classificação quanto ao grupo ecológico, as sementes de *Anadenanthera colubrina* recém-beneficiadas, com 29,5% de água e 89% de plântulas emergidas, foram desidratadas a 7,3% de água e apresentaram 94% de emergência. Após o armazenamento por 90 dias, a -18°C, as sementes desidratadas apresentaram 91% de emergência, sendo classificadas como ortodoxas.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D. C. A.; MEDEIROS, A. C. S. Comportamento fisiológico de sementes de branquilha (*Sebastiania commersoniana* – *Euphorbiaceae*) em

relação ao armazenamento. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.15, n.1, 2, 3, p. 291, ago. 2005.

ABREU, J. C. de. **Potencial alelopático do angico vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speg)**: efeito sobre a germinação de sementes e ciclo mitótico de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). 1997. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T.S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n. 32, n. 10, p. 987-991, out. 1997.

ARAKAWA, T.; CARPENTER, J. F.; KITA, Y. A.; CROWE, J. H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. **Cryobiology**, San Diego, v. 27, n. 4, p. 401-415, Aug. 1990.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Heidelberg; Springer-Verlag, 1995. v. 32, p 3-28.

BENSON, E. E.; LYNCH, P. T.; STACEY, G. N. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. **Agricultural Biotechnological New Information**, Amsterdam, n. 10, n. 5, p. 133-142, 1998.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BONNER, F.T. Storage of seeds: potencial and limitations for germoplasm conservation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 35, n. 1/2, p.35-43, June 1990.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3. ed. Fortaleza: Tip Progresso, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Diversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira**. Brasília: MMA/SBF, 2002. 404p.

BUZÓ, A. de A.; ROSA, C.A. da, DODE, L.B. Controle da umidade de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) com solução salina saturada de acetato

de potássio e criopreservação em nitrogênio líquido. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO, 9., 2001, Pelotas: FAEM/UFPel, 2001.

CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPACNPq, 1998. p. 87-132.

CARVALHO, J. M. F; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. **22 p. (Documentos, 115)**. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/publicacoes/2003/DOC115.PDF>>. Acesso em: 01 ago. 2008.

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

CARVALHO, L. R. de; SILVA, E. A. A. da; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p.15-25, 2006.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa Produção de Informação, 1994. 640p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1, 1039 p.

CERQUEIRA, E.B.; PINHEIRO, J.D.; ROSA, M.E.C.; CHAVES FILHO, J.T. Estudo da germinação e viabilidade de angico (*Anadenanthera peregrina* (L.) Spq. *Leguminosae-Mimosoideae*) sob condição de armazenamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2001. 3 p. 1 CD-ROM.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N. Factors affecting *Campsis radicans* seed germination and seedling emergence. **Weed Science**, Lawrence, v. 48, n. 2, p. 212–216, Mar./Apr. 2000.

CHEN, S.Y.; CHIEN, C.T.; CHUNG, J.D.; YANG, Y.S.; KUO, S.R. Dormancy-break and germination in seeds of *Prunus campanulata* (Rosaceae): role of covering layers and changes in concentration of abscisic acid and gibberellins. **Seed Science Research**, Wallington, v. 17, n. 1, p. 21-32, Mar. 2007.

CHIN, H. F. Seedbanks: conserving the past for the future. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 2, p. 385-400, 1994.

CHIN, H.F., KRISHNAPILLAY, B.; STANWOOD, P.C. Seed moisture: recalcitrant vs. orthodox seeds. In: STANWOOD, P. C.; MCDONALD, M.B. (Ed.). **Seed moisture**. Madison: Crop Science Society of America, 1989. p.15-22.

CID, P. B. A propagação in vitro de plantas o que é isto? **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n. 19, p.16-21, mar./abr. 2001.

COLLINS, G. B.; GROSSER, J. W. Culture of embryos. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic, 1984. p. 241-257.

COSTA, R.B.; KAGEYAMA, P.Y.; MARIANO, G. Estudo do sistema de cruzamento de *Anadenanthera falcata* Benth., *Vochysia tucanorum* Mart. e *Xylopia aromatica* Baill. Em área de cerrado. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.1, p. 93-96, 1992.

CUNHA, R. da. Métodos alternativos para conservação de germoplasma-semente. In: PUIGNAU, J. P. (Ed.). **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA, 1996. p. 123-128. (Dialogo, 45).

DANTAS, B.F.; SANTOS, G.C.; SANTOS, J.S.; SIMÕES, C.A.; ARAGÃO, C.A. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de angico armazenadas em diferentes tipos de embalagens e ambientes. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v.15, n.1, 2, 3, p. 280, ago. 2005.

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

- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. **Parasitica**, Gembloux, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.
- DIAS, B.F. de S. Conservação da natureza no cerrado brasileiro. In.: PINTO, M.N. (Org.). Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. Brasília: Ed. Universidade de Brasília: SEMATEC, 1994. p. 607-646.
- DINIZ, C. E. F.; PAES, J. B.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 8., 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SBS/SBEF, 2003. 1 CD-ROM.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-117, Sept. 1990.
- FAIAD, M. G. R.; SALOMÃO, A. N.; SANTOS, I. R. I. dos. Estratégias e resultados da conservação de germoplasma-semente a longo prazo. Disponível em: <<http://www.clubedofazendeiro.com.br/cietec/artigos/ArtigosTexto.as...>>, 19/8/2005. Acesso em: 01 ago. 2008.
- FELLOWS, L. E.; BELL, E. A. Indole metabolism in *Piptadenia peregrina*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 10, n. 9, p. 2083-2091. Sept. 1971.
- FRANCO, A. A. Fixação biológica do nitrogênio na agricultura tropical. In: ALVAREZ, V. C.; FONTES, L. E.; FONTES, M. P. (Ed.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, MG: SBCS: UFV/DPS, 1996. p. 505-523.
- FRIDBORG, G.; PEDERSÉN, M.; LANDSTRÖM, L. AND ERIKSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 2, 104-10, 1978.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part 1: the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.
- GOMES, A. P. S.; LOPES, J. C.; CAPUCHO, M. T. Estudo das características físicas e viabilidade de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan – *Fabaceae-Mimosoideae*) durante o armazenamento. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 7, n. 1, 2, p. 70, jul./ago. 1997.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino.** Pirassununga: RAF, 2004. 92 p.

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

HAMPTON, J. G. Vigour testing within laboratories of the international seed testing association: a survey. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 20, n. 2, p. 427-452, 1973.

HICKS, G. S. Patterns of organ developmental in plant tissue culture and the problem of organ determination. **The Botanical Review**, New York, v. 46, n. 1, p. 1-23, Mar. 1980.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 371-393.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES.
GeneFlow: a publication about the earth's plant genetic resources. Rome, 1993. p. 19.

KOGER, C. H.; POSTON, D. H.; REDDY, K. N. Effect of spray coverage on control of pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 18, n. 1, p. 124-130, Jan./Mar. 2004.

KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

LITZ, R. E.; JAISWAL, V. S. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. In: DEBERG, P.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and applications.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 247-263.

LOPES, K. P.; ALMEIDA, F. de A. C.; CARVALHO, M. J. F. C.; BRUNO, R. de L. A. Protocolo para crioconservação de mamona (*Ricinus communis* L.). CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 352 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação, e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 1, 384 p.
- MACHADO, C. F. **Metodologia para a condução do teste de germinação e utilização de raios-X para a avaliação da qualidade de sementes de aroeira-branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.** 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- MACHADO, I. C. S.; BARROS, L. M.; SAMPAIO, E. V. S. B. Phenology of caatinga species at Serra Talhada, PE, northeastern Brazil. **Biotropica**, St. Louis, v. 29, n. 1, p. 57-68, Mar. 1997.
- MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z, 2004. p. 104-114.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.
- MARQUES, M. A. **Secagem e armazenamento de sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Bentham) Altschul e *A. colubrina* (Velloso) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 2007. 124 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MATA, M. E. R. M. C. Tecnologia de crioconservação de sementes de urucum. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 2, n. 1, p. 1-9, mar. 2008.
- MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Germination stimulators and inhibitors: their effects and their possible regulatory role. In: MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The Germination of seeds**. 4. ed. Toronto: Pergamon, 1989. Cap. 6, p. 174-178.
- MEDEIROS, A. C. de S.; CZARNESKI, C. M.; FREITAS, G. F. de. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL.) Engl.). In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p. 544-547.

- MEDEIROS, A. C. S.; CAVALLARI, D. A. N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. 1. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196°C). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 73-75, 1992.
- MELO, R. R. de; FERREIRA, A. G.; JUNIOR, F. R. Efeito de diferentes substratos na germinação de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) em condições de laboratório. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n. 5, jan., 2005.
- MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p.72-81, 2006.
- MORETÃO, M. P. **Propriedades biomoduladoras da arabinogalactana (aragal) de *Anadenanthera colubrina* (angico branco)**. 2004. 161 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- NASCIMENTO, P. K.V. do. **Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan**. 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- NASCIMENTO, P. K. V. do; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 141-143, 2007a. Suplemento.
- NASCIMENTO, P. K. V. do; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Indução de calogênese em explantes de *Parapiptadenia rigida*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 84-86, 2007b. Suplemento.
- NEPOMUCENO, C. F. **Crescimento *in vitro* e controle morfofisiológico em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 2006, 70p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santa.
- NÓBREGA, M. B. de M.; ANDRADE, F. P.; SANTOS, J. W.; LEITE, E. J. Germoplasma. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 350 p.
- PAES, J. B.; MARINHO, I. V.; LIMA, R. A. de.; LIMA, C. R.; AZEVEDO, T. K. B. de. Viabilidade técnica dos taninos de quatro espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro no curtimento de peles. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 453-462, out./dez. 2006.

- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura.** Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações.** Lavras: Ed. Brasil, 1997.
- PATREZE, C. M. **Fixação de nitrogênio e micorrização em leguminosas de mata ciliar.** 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 3, p.185-197, Sept. 2001.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** 3. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.
- PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; PIRATELLI, A. J. Aspectos ecológicos da produção de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais.** Brasília: ABRATES, 1993. p. 47-81.
- RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient Plant Regeneration via Shoot Tip Explant in *Jatropha curcas* L. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, New Delhi, v. 14, n. 1, p. 73-75, Jan. 2005.
- REDENBAUGH, K. Encapsulation of somatic embryos. In: REDENBAUGH, K.; FUJII, J. A.; SLADE, D. **Synseeds: application of synthetic seeds to crop improvement.** Boca Raton: CRC, 1991. p. 203-215.
- REIS, A. M. M.; CUNHA, R. da. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) SPEG. com diferentes conteúdos de umidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 10, p. 1071-1079, out. 1997.
- RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira.** São Paulo: Edgard Blucher, 1978. 296 p.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

- ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Forestry Research**, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, May, 1978.
- SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag, New York: Heidelberg, 1995. p. 53-69.
- SALOMÃO, A. N. Respostas de sementes de espécies tropicais a exposição ao nitrogênio líquido. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 14, n. 2, p. 133-138, May/Aug. 2002.
- SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: Embrapa, 2004. 23 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documento, 115).
- SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R. C.; RIBEIRO, F. N. S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)**. Brasília: Embrapa, 2002. 4 p. (Comunicado Técnico, 69).
- SIMPSON, G. G.; DEAN, C. *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? **Science**, Washington, v. 296, n. 5566, p. 285–289, Apr. 2002.
- STANWOOD, P. C. Conservation of seed germoplasm – an update. In: ANNUAL MEETING OF AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY, 73., 1981, Atlanta. **Agronomy Abstract...** Madison: American Society of Agronomy, 1981. p. 121.
- STIRMART, D. P. Commercial micropropagation of florist flower crops. In: ZIMMERMAN, R. H. et al. (Ed.). **Tissue culture as a plant production systems for horticultural crops**. Dordrecht: M. Nijhoff, 1986. p. 301-315.
- STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1995. p. 87-101.
- STYLES, E. D.; BURGESS, J. M.; MASON, C.; HUBER, B. M. Storage of seed in liquid nitrogen. **Cryobiology**, San Diego, v. 19, n. 2, p. 195-199, 1982.
- TARRÉ, E.; PIRES, B. B. M.; GUIMARÃES, A. P. M.; CARNEIRO, L. A.; FORZZA, R. C.; MANSUR, E. Germinability after dessication, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. Ex Schult &

Schult.f. and *Dyckia* Schult. & Schult.f. species (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 777-783, out./dez. 2007.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 311-336.

TILQUIN, J.P. Plant regeneration from stem callus of cassava. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, n. 16, p. 1761-1763, 1979.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq/ EMBRAPA SPI, 1998. p. 11-20.

THE UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Conservation on biological diversity**. Rio de Janeiro, 1992. 224 p. (Na. 92-7807).

VARELA, V. P.; COSTA, S. S.; RAMOS, M. B. P. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de itaubarana (*Acosmium nitens* (Vog.) Yakovlev) – *Leguminosae, Caesalpinioideae*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 35-39, mar. 2005.

VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Fisiología ecológica de semillas en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz, México. **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v. 35, n. 1, p. 85-96, 1987.

VIDAVER, W. Light and seed germination. In: KHAN, A. A. (Ed.). *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. New York: North-Holland, 1980. p. 181-192.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n. 14, p. 18-20, maio/jun. 2000.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, July/Sept. 1996.

VILLAMIL, J. P. **Crioconservación de semillas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 26., 1997, Campina Grande. **Minicurso...** Campina Grande: SBEA, 1997. 52 p.

WALTERS, C.; RAO, N. K.; HU, X. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 1, p. 15-22, Mar. 1998.

WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. **The control of growth & differentiation in plants**. Great Britain: Pergamon, 1970.

WETZEL, M. M. V. S.; REIS, R. B.; RAMOS, K. M. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, n. 26, 2003.

WITHERS, L. A.. Cryopreservation and storage of germoplasm. **Plant Cell Reports**, Oxford, v. 4, n. 2, p.169-191, 1985.

ZIV, M. *In vivo* hardening and acclimatization of tissue plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1987. p. 187-196.

CAPÍTULO II

ESTUDOS MORFOANATÔMICOS DE FRUTO E SEMENTE, E ALGUNS ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

1 RESUMO

NERY, Fernanda Carlota. Estudos morfoanatômicos de fruto e semente e alguns aspectos fisiológicos da germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. In:_____. **Germinação, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. 2008. Cap. 2, p. 34-86. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Conhecer aspectos morfoanatômicos, composição química e germinação das sementes de espécies nativas do Cerrado e de outros biomas, como o angico-vermelho (*A. colubrina*), espécie arbórea da família *Fabaceae*, subfamília *Mimosoideae*, pode auxiliar, por exemplo, a produção de mudas de alta qualidade, buscando a recuperação de áreas degradadas. Dessa maneira, objetivou-se estudar a morfologia e a anatomia dos frutos e sementes, a composição química de sementes, bem como as respostas a fatores como embebição, regimes térmicos e substratos na germinação de sementes. Na caracterização dos tecidos da semente, foi empregado teste histoquímico com Sudan III e Lugol. A composição química da semente foi feita avaliando-se as características: grau de umidade, extrato etéreo, proteína bruta, amido, açúcares redutores e não redutores, fibra bruta e taninos. As temperaturas testadas no teste de germinação foram de 25°C, 30°C, 15°C-25°C e 20°C-30°C, em substrato rolo de papel. Analisaram-se, ainda, diferentes substratos para germinação (rolo de papel Germitest®, sobre papel Germitest®, Plantmax® e sobre areia), em condição de presença de luz, a 30°C. A anatomia seminal de *A. colubrina* é típica das leguminosas, especialmente considerando-se a subfamília *Mimosoideae*. O número de sementes por fruto é, em média, de 10 e o peso de mil sementes varia de 117 g a 120 g. A composição química das sementes se caracteriza pela presença de elevados teores de proteína, seguida de extrato etéreo e baixo conteúdo de amido. Sementes de *A. colubrina* não apresentam dormência tegumentar. A maior porcentagem de germinação ocorre a 30°C, 15°C-25°C e 20°C-30°C, sendo as sementes indiferentes à luz. A temperatura de 25°C contribui para um aumento substancial do percentual de plântulas anormais e sementes mortas, tanto na ausência como na presença de luz. Os substratos areia e Plantmax® são eficientes na avaliação do desenvolvimento de plântulas.

* Comitê Orientador: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (orientador), Renato Paiva, PhD – UFLA, José Márcio Rocha Faria, PhD – UFLA, Dr^a Cristina Filomena Justo – UFMT (co-orientadores).

2 ABSTRACT

NERY, Fernanda Carlota. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan seeds and fruits morphological anatomical studies and some physiological aspects of the seeds germination. In: _____. **Germination, *in vitro* cultivation and freezing tolerance of red angico seeds** (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan). Chap. 2, p. 34-86. 2008. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Knowing the morphological anatomical aspects, chemical composition and seeds germination of native species of the Cerrado and other biomes as the red angico (*A. colubrina*), tree species of the family *Fabaceae*, subfamily *Mimosoideae*, may help, for example, in the production of high quality seedlings aiming the recovery of degraded areas. Thus, it was aimed to study the seeds and fruits morphology and anatomy, seeds chemical composition, and the seeds germination responses to factors such as imbibitions, thermal systems and substrates. In the characterization of the seeds tissues, it was used the histochemical test with Sudan III and Lugol. The seeds chemical composition was made assessing the characteristics: moisture content, ether extract, crude protein, starch, reducing and not reducing sugars, crude fiber and tannins. The temperatures tested in the germination test were 25°C, 30°C, 15°C-25°C and 20°C-30°C, in the substrate rolled paper. Also, it was analyzed different substrates to germination (rolled paper Germitest®, paper Germitest®, Plantmax® and sand), in the presence of light, at 30°C. The seminal anatomy of *A. colubrina* is typical of legumes, especially considering the subfamily *Mimosoideae*. The number of segments in each fruit is in average 10, and the weight of one thousand seeds varies between 117 g to 120 g. The seeds chemical composition is characterized by the presence of high contents of protein, followed by the ether extract, and low contents of starch. *A. colubrina* seeds did not showed tegumentar dormancy. The highest germination percentage occurs at 30°C, 15°C-25°C and 20°C-30°C, being the seeds indifferent to light. The temperature of 25°C contributes to a substantial increase in the percentage of abnormal seedlings and dead seeds, both in the absence and presence of light. The substrates sand and Plantmax® are effective in the seedlings development assessment.

* Adviser Comitee: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Adviser), Renato Paiva, PhD – UFLA, José Márcio Rocha Faria, PhD – UFLA, Dr^a Cristina Filomena Justo – UFMT (Co-advisers).

3 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem crescido o interesse pela propagação de espécies florestais nativas, devido à ênfase atual que governos e entidades não governamentais (ONGS) vêm dando a problemas ambientais, ressaltando-se a necessidade de recuperação de áreas degradadas e recomposição da paisagem. Diante dessa problemática, estudos envolvendo tecnologia de sementes, a ecofisiologia das espécies e os estudos de dinâmica da regeneração, associadas aos levantamentos florísticos e fitossociológicos são de fundamental importância para o estabelecimento de modelos que possam ser adotados e aplicados nos programas de manejo, na condução do processo de regeneração natural e na recuperação florestal de áreas degradadas (Candiani, 2006).

Diante do exposto, verifica-se a necessidade de se obterem informações básicas sobre a germinação, cultivo e potencialidade dessas espécies nativas, visando à sua utilização para os mais diversos fins. Entretanto, o conhecimento disponível é ainda incipiente, ao considerar aspectos como análise e manejo de sementes da maioria das espécies potenciais, de modo a fornecerem dados que possam caracterizar seus atributos físicos e fisiológicos. Como uma dessas espécies, pouco freqüente, mas amplamente difundida pelo Brasil e países vizinhos, destaca-se o angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul).

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan apresenta-se com várias sinonímias, *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg., *Piptadenia falcata* Benth., *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* e *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan, conhecidas popularmente como angico-vermelho. São árvores comuns no Brasil, bastante conhecidas pelo teor de taninos presentes em sua casca. Possuem caule com casca grossa e rugosa, fendida e avermelhada. Suas folhas

são compostas bipinadas, flores em capítulos globosos e suas vagens são achatadas (Lorenzi, 2000; Chaves et al, 2006; Austrália, 2007). Os angicos, de modo geral, apresentam regeneração natural por sementes. Sua produção é anual, com grande quantidade de sementes viáveis, sendo sua dispersão barocórica.

O estudo da morfologia de sementes e das plântulas, bem como da germinação de sementes, é de relevância para se conhecer o comportamento das espécies no tocante à sua produção, o que possibilita prever e estabelecer condições adequadas de conservação (Oliveira, 1993).

A importância do conhecimento sobre o comportamento germinativo e o desenvolvimento das plântulas foi demonstrada por Labouriau et al. (1963), quando utilizaram as características morfológicas de plântulas para estudar a regeneração natural do cerrado. A partir desses estudos morfológicos de sementes e de plântulas, puderam-se obter informações sobre a maturação das sementes, germinação, armazenamento, viabilidade e métodos de semeadura (Anez et al., 2005; Borges et al., 2005).

A caracterização biométrica de frutos e sementes fornece subsídios importantes para a diferenciação de espécies pioneiras e não pioneiras em florestas tropicais e de espécies de um mesmo gênero relacionado às características de dispersão e estabelecimento de plântulas (Baskin & Baskin, 1998; Cruz et al., 2001; Fenner, 1993; Silva & Filho, 2006).

A diversidade morfológica dentro da família *Fabaceae* gera uma série de problemas taxonômicos. Dessa forma, é cada vez maior a procura por informações a respeito dos frutos, sementes e plântulas de espécies dessa família, de forma a complementar aquelas provenientes de órgãos vegetativos e flores (Oliveira, 1999).

Gunn (1984), citado por Oliveira (1999), considerou que o grau de desenvolvimento da plúmula é um caráter útil na identificação de sementes e no

estabelecimento de relações filogenéticas. O autor afirma, ainda, que dados sobre as plúmulas de leguminosas são raramente encontrados, o que dificulta a realização de análises taxonômicas e filogenéticas a partir dessas estruturas.

Com relação às espécies tropicais nativas, Araújo Neto et al. (2003) mostraram que muito pouco se conhece sobre as exigências das sementes quanto aos efeitos da temperatura, luz e substrato ideal para a germinação, sobretudo para as espécies típicas de vegetação secundária. Enfocando a germinação como resultado de uma série de reações bioquímicas e de retomada de crescimento do embrião, observa-se a existência de estreita dependência da temperatura. Como em qualquer reação química, existe uma temperatura ótima na qual o processo se realiza mais rápida e eficientemente, fator esse amplamente variável entre diferentes espécies (Bewley & Black, 1994).

No tocante ao comportamento germinativo de espécies fotoblásticas, encontram-se sementes que germinam somente após rápida exposição à luz, outras que necessitam de período amplo de exposição, enquanto em outras, a germinação é desencadeada somente no escuro. Destacam-se também as espécies com sementes indiferentes à luz (Araújo Neto et al., 2003).

Particularmente sobre a espécie *A. colubrina*, apesar de sua potencialidade, são escassas as informações sobre os fatores que afetam a germinação de suas sementes. Dessa maneira, objetivou-se estudar a morfologia e a anatomia do fruto e das sementes, a composição química de sementes, bem como as respostas dessas aos fatores como embebição, regimes térmicos e substratos na germinação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Frutos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foram coletados em, aproximadamente, 50 árvores matrizes localizadas no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na época da dispersão, entre os meses de agosto e setembro de 2007. A região se localiza no município de Lavras, sul do estado de Minas Gerais, nas coordenadas geográficas 21°13'17''S e 44°57'47''W. O clima da região é do tipo Cwb de Koppen (mesotérmico com verões brandos e estiagens de inverno), a precipitação e a temperatura média anual são, respectivamente, de 1.493,2 mm e de 19,3°C, com 66% da precipitação ocorrendo no período de novembro a fevereiro (Vilela & Ramalho, 1979).

Posteriormente à coleta, os frutos foram encaminhados ao Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia da UFLA para processamento, sendo as sementes retiradas e divididas em dois lotes de sementes. O primeiro lote foi constituído de sementes que se dispersaram naturalmente, ou seja, coletadas no chão (lote A) e sementes obtidas de frutos fechados (lote B). Nessa última condição, os frutos, de coloração amarronzada, foram dispostos para secar à sombra até a deiscência natural. As sementes foram acondicionadas em embalagens de polietileno e armazenadas em câmara fria (8°C e 45% de umidade relativa), segundo recomendação de Espinoza (2004). No pré-armazenamento, as sementes tiveram o seu grau de umidade monitorado em estufa a 105±3°C, por 24 horas (Brasil, 1992), sendo então armazenadas com 9% e 8% de grau de umidade, para os lotes A e B, respectivamente.

4.2 Caracterização morfológica de frutos e sementes

Foram selecionados, aleatoriamente, 100 frutos maduros, de coloração amarronzada, procedentes de 50 árvores matrizes. Utilizou-se paquímetro da marca Vonder®, com precisão de 0,05 mm, procedendo-se as medições de comprimento e largura dos frutos e sementes. Por comprimento, entendeu-se a distância longitudinal entre o ápice e a base e, por largura, a medida perpendicular à região mediana dos frutos, sendo os mesmos expressos em centímetros (cm). A determinação da espessura das sementes foi feita utilizando-se paquímetro digital da marca Mitutoyo Sul Americana Ltda., com precisão de 0,01 mm.

O número de sementes por fruto foi obtido a partir de uma amostra constituída por 100 frutos e o peso de mil sementes determinado utilizando-se 8 repetições de 100 sementes, pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g, de acordo com Brasil (1992) e a média dos dados expressa em gramas (g).

4.3 Teste histoquímico das sementes

O teste histoquímico foi realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, no Departamento de Biologia da UFLA.

As sementes foram submetidas a cortes manuais de seções transversais utilizando navalha de micrótomo e posterior coloração com safranina e fluoroglucinol. Os cotilédones e os eixos embrionários foram submetidos a cortes transversais para determinar o tipo de reserva, utilizando-se os seguintes reagentes: Lugol, para qualificar a presença de amido e Sudan III, para a identificação de corpos lipídicos (Kraus & Arduin, 1997). Seguiu-se a montagem de lâminas provisórias e semipermanentes, segundo técnicas descritas por Johansen (1940). As observações visuais foram realizadas em microscópio

Olympus CBB, com documentação fotográfica realizada utilizando-se máquina digital Canon®, com resolução de 7,0 megapixels e zoom óptico de 8x.

4.4 Caracterização ultra-estrutural de eixos embrionários

Os eixos embrionários foram fixados em Karnovsky modificado: glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2 e CaCl₂ 0,001 M (Karnovsky, 1965), sendo mantidos em geladeira, a 10°C, até posterior processamento.

As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo padrão do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Para isso, foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,05 M, durante 10 minutos e imersas em glicerol 30%, como crioprotetor, durante 30 minutos. Para a realização dos cortes transversais, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, fraturadas com bisturi em superfície resfriada para expor os tecidos internos da semente (Alves, 2004). Os eixos embrionários foram seccionados transversalmente em nitrogênio líquido para a observação ao microscópio eletrônico de varredura. O material seccionado foi lavado em água destilada e pós-fixado com tetróxido de ósmio (1%), durante 4 horas, à temperatura ambiente, em capela, seguindo-se três lavagens com água destilada durante 5 minutos e desidratação em gradiente crescente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), durante 10 minutos em cada solução e três vezes em acetona pura (100%). As amostras foram levadas para secagem ao ponto crítico com CO₂ líquido no aparelho CPD 030 (Balzers). As amostras foram, então, montadas em porta-amostras (*stubs*). A seguir, receberam uma cobertura de ouro no evaporador SCD 050 (Balzers). A análise foi realizada em microscópio

eletrônico de varredura modelo Leo Evo 40, sendo as imagens digitais obtidas pelo software Leo User Interface (Alves, 2004).

4.5 Composição química das sementes

A determinação da composição química das sementes foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular, no Setor de Fisiologia Vegetal (DBI), e no Laboratório de Produtos Vegetais no Departamento de Ciência dos Alimentos, na UFLA.

As sementes de *A. colubrina* do lotes A e B tiveram suas partes (cotilédones e eixo embrionário) separadas manualmente, sendo também retirado o tegumento. Em seguida, sementes intactas, cotilédones e eixos embrionários foram secos em estufa, a 60°C, por 72 horas, sendo, posteriormente, moídos em graal. Os tratamentos foram distribuídos seguindo um delineamento inteiramente casualizado e a análise de variância foi efetuada em arranjo fatorial 3 x 2 (sementes intactas, cotilédones e eixos embrionários x lotes), com três repetições para cada variável analisada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% significância.

Foram realizadas as seguintes determinações:

a) Grau de umidade

Pesaram-se, aproximadamente, 0,5 g de sementes moídas em placas de Petri de 7 cm previamente secas e taradas. Em seguida, foram secas em estufa regulada a 105±3°C, por 24 horas, e os dados expressos em porcentagem, conforme método descrito pela Association of Official Analytical Chemists (1990).

b) Teor de extrato etéreo

Pesou-se, aproximadamente, 1,0 g de sementes moídas, as quais foram transferidas quantitativamente para o cartucho de Soxhlet. A extração direta da amostra com éter etílico foi realizada em extrator contínuo de Soxhlet, utilizando reboiler previamente seco e tarado. Após a extração, o reboiler contendo o resíduo foi levado para a estufa a 65°C, por 24 horas, e este foi posteriormente pesado, sendo os resultados expressos em percentagem (Association of Official Analytical Chemists, 1990).

c) Teor de amido

Pesaram-se 0,5 g de sementes moídas em tubo de centrífuga, sendo adicionado ao tubo 10 mL de etanol 80%. Posteriormente, o tubo foi incubado, em 40°C, por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 5.000 g, por 20 minutos e o sobrenadante separado do precipitado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes unidos e guardados para a quantificação de aminoácidos. Ao precipitado foram adicionados 10 mL de ácido perclórico a 30% para a sua ressuspensão e, posteriormente, colocados em banho de gelo, por 40 minutos. Após tal procedimento, a amostra foi centrifugada a 5.000 g, por 20 minutos, a solução filtrada e seu volume completado para 50 mL de água destilada.

A quantificação do teor de amido, em equivalente de glicose, foi realizada pelo método de antrona, segundo Yemm & Willis (1954).

d) Teores de açúcares solúveis totais, redutores e não redutores

Os açúcares solúveis totais, redutores e não redutores foram extraídos pelo método de Lane-Enyon (AOAC, 1990) e determinados pela técnica de Somogy, adaptada anteriormente por Nelson (1944). Foram pesados 5,0 g de sementes moídas, adicionaram-se 50 mL de etanol 70%, seguindo-se neutralização com ácido acético glacial e, finalmente, completando-se o volume para 100 mL. Em

seguida, foi feita leitura de absorbância em espectrofotômetro (Beckman DU-640) a 510 nm.

No mesmo extrato, foram determinados os açúcares não redutores, foi realizada a hidrólise ácida da sacarose, acidificando o filtrado anterior com 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, as amostras foram levadas para banho-maria fervente, por 15 minutos e, posteriormente, neutralizadas em solução saturada de carbonato de sódio. Seguiu-se a desproteíntização do extrato com água destilada, solução de hidróxido de bário 0,3 N e solução de sulfato de zinco 5%. Os tubos foram agitados, filtrados e a leitura de absorbância realizada em espectrofotômetro, a 510 nm.

A determinação dos açúcares não redutores foi realizada pela diferença entre o valor apresentado para açúcares totais e açúcares redutores, convertida para o valor real multiplicado pelo fator 0,95 (Nelson, 1944).

g) Teor de proteína bruta (N total)

Pesaram-se 50 mg de amostra, sendo a mesma transferida para tubo de digestão; adicionaram-se 1,5 g de sulfato de potássio e 0,3 g de sulfato de cobre, acrescentando-se, posteriormente, 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram levados para o bloco digestor, a 50°C, aumentando-se a temperatura lentamente, até atingir 370°C. A mistura foi deixada no bloco digestor até que a solução apresentasse cor verde-clara. Depois de esfriada, adicionaram-se 30 mL de água destilada, agitando-se até dissolver o resíduo, estando o material pronto para a determinação do nitrogênio total.

Na determinação do teor de nitrogênio total, utilizou-se o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1990), aplicando-se o fator 6,25 para o cálculo do teor de proteína bruta.

e) Teor de aminoácidos

A quantificação de aminoácidos foi realizada pelo método da Ninhidrina (Yemm & Cocking, 1955), nos sobrenadantes resultantes das duas

centrifugações realizadas para a determinação do teor de amido. Utilizou-se alíquota de 0,1 mL de amostra. A absorvância foi determinada a 570 nm em espectrofotômetro Beckman DU-640, contra um padrão de glicina. Os dados foram expressos como μmol de aminoácidos por grama de peso seco de semente.

f) Teor de fibra bruta

Para a determinação do teor de fibra bruta, pesou-se 0,5 g de material desengordurado, adicionaram-se 17,5 mL de ácido acético 70%, 0,5 g de ácido tricloracético (PA.) e 1,2 mL de ácido nítrico (PA.). Deixou-se em repouso por 30 minutos a partir da ebulição (110°C). Em seguida, os cadinhos foram levados para estufa a $105\pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas. A diferença entre o peso do conjunto e o peso do cadinho vazio expressou a quantidade de fibra bruta na amostra (Vande Kamer & Van Ginkel, 1952). A determinação de fibra bruta foi realizada somente em sementes intactas, para ambos os lotes de sementes.

g) Teor de taninos

Os teores de taninos foram determinados pelo método de Goldstein & Swain (1963), utilizando como extrator o metanol 50% (u/v) e identificados de acordo com o método de Folin Denis, descrito pela AOAC (1990). A determinação de taninos foi realizada somente em sementes intactas, para ambos os lotes de sementes.

4.6 Curva de embebição de sementes

A construção da curva de embebição das sementes foi realizada nos lotes A e B de sementes, descritos anteriormente. As sementes foram divididas em quatro amostras de 25 sementes cada e colocadas em rolo de papel Germtest® umedecido com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel e, em seguida, transferidas para a câmara de germinação, à temperatura de

30°C, na presença de luz. A primeira pesagem foi realizada com as sementes secas e, posteriormente, a cada 30 minutos, durante as primeiras 12 horas de embebição; nas 12 horas subsequentes, as pesagens foram realizadas de hora em hora e, posteriormente, a cada três horas. O processo de embebição das sementes foi acompanhado por 48 horas.

A porcentagem de incremento sobre a massa fresca inicial foi calculada por meio da expressão:

$$\% \text{ de incremento sobre a massa fresca inicial (MFI)} = \frac{MFU - MFI}{MFI} * 100$$

em que *MFU* = massa fresca úmida e *MFI* = massa fresca inicial.

Para ajuste da curva aos dados de embebição, foi utilizado o modelo não linear com maior coeficiente de determinação (R^2). Procurou-se estabelecer, para cada tratamento, uma equação de 3º grau que se ajustasse ao padrão trifásico da germinação e delimitasse o início, o final e a duração das fases do processo germinativo. Após a derivação da equação de 3º grau, determinaram-se as raízes da equação derivada de 2º grau e os pontos de inflexão às curvas expressas em porcentagem de incremento de massa por hora ($\% h^{-1}$), considerando o ponto médio de cada intervalo para o valor de *x* (Rodrigues et al., 2008).

4.7 Efeito da temperatura e luminosidade na germinação de sementes

Sementes dos lotes A e B foram submetidas a diferentes regimes térmicos, na ausência ou na presença de luz constante, em ambiente com 100% de umidade relativa. Os testes de germinação foram conduzidos a temperaturas constantes (25°C e 30°C), em câmara de germinação do tipo Mangelsdorf®, enquanto os de temperaturas alternadas (15°C-25°C e 20°C-30°C) foram conduzidos em câmara de germinação do tipo BOD, com controle fotoperiódico.

O substrato utilizado foi o rolo de papel Germtest® umedecido com água destilada 2,5 vezes o peso do papel, colocado em béqueres de 250 mL contendo lâmina d'água de 2,0 cm e cobertos com sacos plásticos para uniformizar a umidade no meio de germinação. Para obter a ausência de luz, os béqueres foram envoltos com embalagens de polietileno preto.

As avaliações de germinação foram realizadas utilizando-se como critério a protrusão radicular a $\pm 2,0$ mm. As sementes germinadas foram mantidas no rolo de papel para o acompanhamento do crescimento inicial e a contagem de plântulas normais, sendo as avaliações feitas aos dez dias. Consideraram-se como plântulas anormais aquelas com ápice da raiz ou epicótilo escurecidos, ausência de epicótilo ou de raiz, raiz ou parte aérea atrofiados, ao final do experimento. Avaliou-se também a porcentagem de sementes mortas, tendo como critério o amolecimento dos tecidos e a presença de micélio de fungos.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado juntamente com a germinação e calculado segundo a equação proposta por Maguire (1962).

Os tratamentos foram distribuídos segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) e a análise de variância efetuada em arranjo fatorial 2 x 2 x 4 (lotes de sementes x condições de luminosidade x temperaturas), com 4 repetições de 25 sementes cada tratamento.

Os dados de porcentagens de plântulas normais e anormais foram transformados utilizando-se \sqrt{x} , visando atendimento das pressuposições da análise de variância. Para as demais variáveis, não houve necessidade de transformação. Para a comparação das médias, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

4.8 Efeito do substrato na germinação de sementes

Sementes dos lotes A e B foram submetidas a diferentes substratos para germinação, rolo de papel Germitest®, sobre papel Germitest®, sobre Plantmax® e sobre areia, em condição de presença de luz, sob temperatura constante de 30°C. O substrato de papel Germitest® foi umedecido com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel; para os demais substratos, utilizaram-se caixas acrílicas do tipo gerbox, sendo adicionada água a partir de observações quanto à necessidade ou não. Utilizou-se câmara de germinação do tipo Mangelsdorf®, sendo mantida a umidade relativa de 100% (Brasil, 1992). A avaliação da germinação foi realizada diariamente, utilizando-se, como critério, a protrusão da radícula a $\pm 2,0$ mm.

Ao final do experimento, após 10 dias, avaliou-se a porcentagem de plântulas normais e anormais, bem como de sementes mortas, como descrito no item 4.7.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi conduzido juntamente com o teste de germinação, sendo as avaliações realizadas diariamente a partir da protrusão da radícula, e calculado segundo a equação proposta por Maguire (1962).

Foi realizado o teste de sanidade, avaliando-se a presença de fungos nas sementes, com auxílio de lupa e microscópio estereoscópio, em virtude do aparecimento destes.

4.9 Caracterização morfológica das plântulas em diferentes substratos

As plântulas obtidas no item 4.8 foram avaliadas, após 10 dias, quanto ao comprimento da parte aérea e do sistema radicular dessas, medidos a partir de 15 plântulas normais de cada repetição, com auxílio de uma régua graduada em

milímetro. Para a determinação da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular das plântulas normais, as partes foram separadas e acondicionadas em sacos de papel previamente identificados e levados à estufa de ventilação forçada, regulada, a 60°C, durante 72 horas. Após esse período, as plântulas foram retiradas da estufa e pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g, sendo os resultados expressos em gramas (g).

Os tratamentos foram distribuídos segundo o delineamento inteiramente casualizado e a análise de variância foi efetuada em arranjo fatorial 4 x 2 (substratos x lotes de sementes), com quatro repetições de 25 sementes cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Morfologia e anatomia dos frutos e sementes

O fruto maduro de *A. colubrina* é do tipo vagem/legume, deiscente, de cor marrom (Figura 1A). Os frutos apresentam formato estreito e margens constrictas. O número de sementes por fruto é variável, sendo dez, em média. O comprimento do fruto varia entre 14 cm e 16 cm e o peso de mil sementes entre 117 g e 120 g. As sementes apresentam comprimento entre 1,43 cm a 1,55 cm, largura ou diâmetro de 1,61 cm a 1,64 cm e espessura entre 0,77 mm e 0,89 mm, para sementes do lote A e B, respectivamente.

A semente apresenta-se morfológicamente achatada e brilhante, com ala estreita (Figura 1B). O embrião, de coloração amarela clara, compõe-se de dois cotilédones planos, foliáceos, de contorno aproximadamente circular, com uma

fenda basal que termina no ponto de inserção destes no eixo hipocótilo-radícula (Figura 1C), que é curto e reto, exposto pela incisão basal dos cotilédones.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os relatados para a mesma espécie, por Espinoza (2004), com comprimento dos frutos entre 18 cm e 20 cm em lotes coletados em anos sucessivos, enquanto a largura média foi de 2,1 cm em amostras procedentes de Cochabamba, Bolívia, em altitudes entre 1.990 m e 2.100 m. Esse mesmo autor relatou que o diâmetro das sementes variou entre 1,66 cm e 1,72 cm.

A observação do eixo embrionário ao microscópio eletrônico de varredura mostrou que a plúmula é diferenciada, com folíolos delimitados (Figura 2A). A plúmula apresenta-se dobrada sobre o longo e arqueado epicótilo, num ângulo de cerca de 180°, como descrito por Oliveira (1999). Numerosos folíolos multifoliolulados distinguem-se na plúmula, em que ráquis e foliólulos são visíveis (Figura 2A). A protoderme é glabra no eixo hipocótilo-radícula e com numerosos tricomas em diferenciação no epicótilo, do tipo glandular pluricelular (Figura 2B). A porção hipocótilo-radicular do eixo não demonstra grande diferenciação (Figura 2C). O procâmbio é constituído por células longas e indiferenciadas (Figura 3A e 3B). O meristema fundamental cortical é reduzido, comparado com a ampla medula, composto por células grandes e vacuolizadas (Figura 3C). Nas extremidades radicular e epicotilar, o grau de vacuolização das células é menor. É possível visualizar o procâmbio, formado por células mais alongadas do que as demais (Figura 3A). A medula do eixo embrionário é constituída por células relativamente grandes, com paredes delgadas e ricas em lipídios (Figura 3A e 3C). Os cotilédones são delgados e ricos em lipídios (Figura 4A), não sendo detectada a presença de amido. O eixo embrionário das sementes de *A. colubrina* é diferenciado; as células são ricas em lipídios e com pouca quantidade de grãos de amido (Figuras 4B, 4C e 4D).

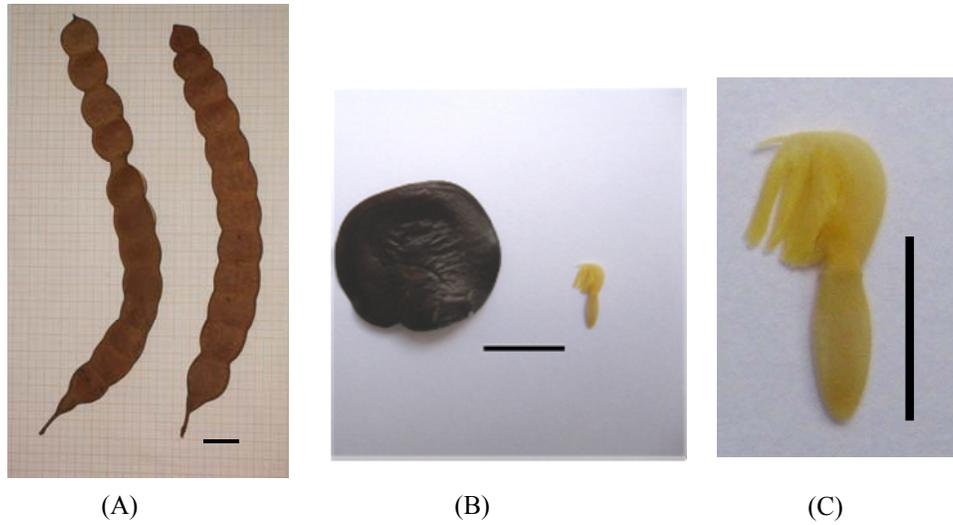


FIGURA 1. Aspecto dos frutos (A), semente inteira com tegumento e eixo embrionário (B e C) de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Barra (A) = 2,0 cm, barra (B) = 1,0 cm e barra (C) = 0,5 cm. UFLA, Lavras, MG, 2008. Autora: Fernanda Carlota Nery.

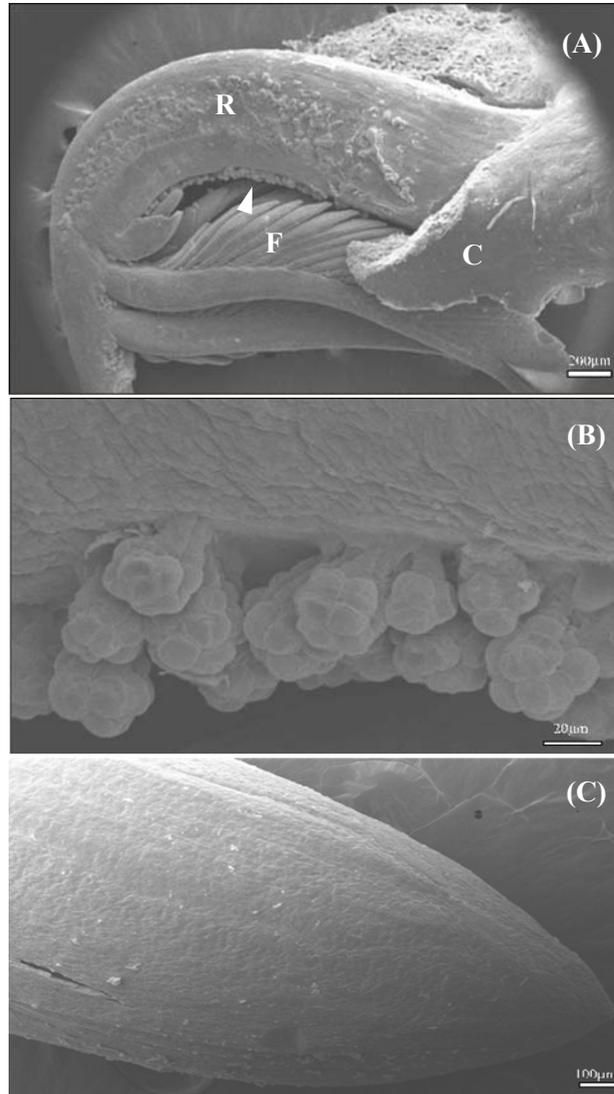


FIGURA 2. Eletromicrografia de varredura de eixo embrionário de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (A) plúmula, (B) tricomas na parte inferior do eixo plúmula-hipócotilo, (C) eixo hipocótilo-radicular (seta: tricomas em diferenciação, F: folíolos, R: ráquis, C: cotilédones aderidos ao eixo). UFLA, Lavras, MG, 2008.

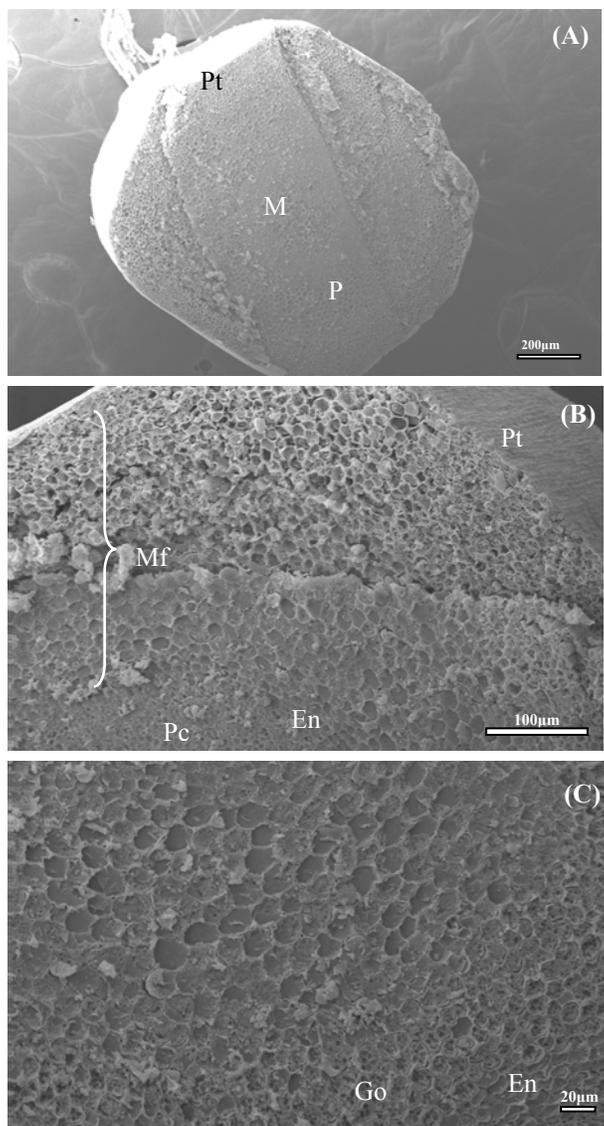


FIGURA 3. Eletromicrografia de varredura de eixo embrionário de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (A) visão geral do eixo embrionário em corte transversal, (B e C) detalhes do eixo embrionário em corte transversal (Pt: protoderme, M: medula, Pc: procâmbio, Mf: meristema fundamental, En: endoderme, Go: células com gotículas lipídicas). UFLA, Lavras, MG, 2008.

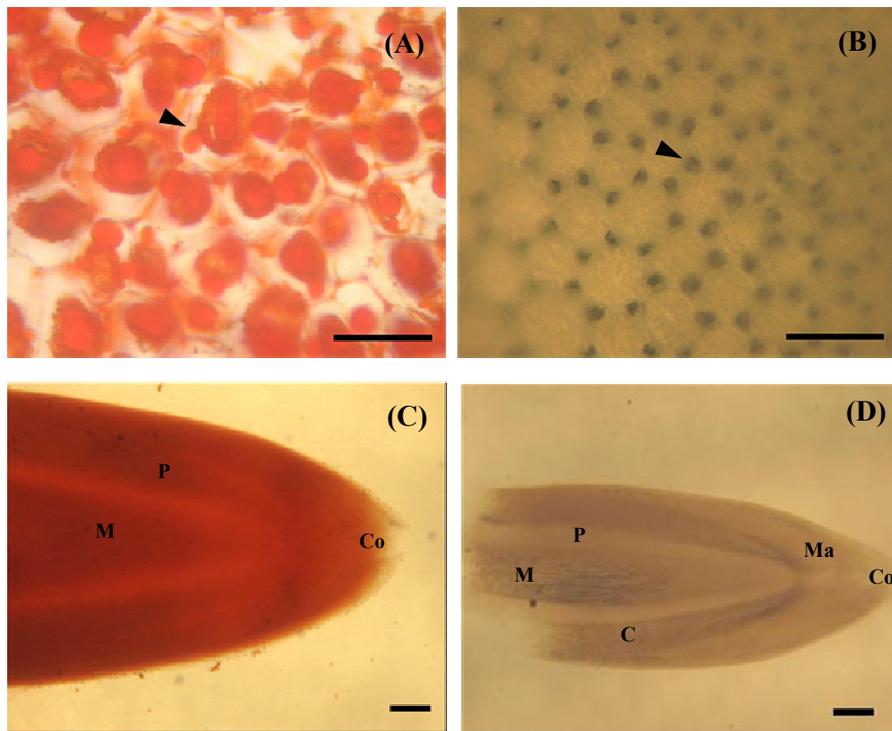


FIGURA 4. Fotomicrografia de seções transversais do tecido cotiledonar (A) e longitudinais do eixo embrionário (B, C e D) de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan., coradas com Sudan III (A e C) e Lugol (B e D) (setas: gotículas de lipídio e grãos de amido, M: meristema fundamental, P: procâmbio, Co: coifa, C: córtex, Ma: meristema apical). Barra = 0,5 μm (A e B) e barra = 2,0 μm (C e D). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Oliveira (1999) descreveu os embriões de duas espécies da subfamília *Mimosoideae*, especialmente o eixo embrionário de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.), como tendo plúmula diferenciada, quando há primórdios foliares distinguíveis, podendo ocorrer diferenciação foliolar, estipular e ou estipelar. O

mesmo autor observou, para *Inga urugiensis*, a presença de numerosos tricomas tectores e glandulares já diferenciados, sendo esta última espécie também tanífera, ocorrendo idioblastos tanto na protoderme quanto no meristema fundamental, em especial na região cortical.

Araújo Neto et al. (2002), estudando a morfologia de sementes de *Acacia polyphylla* DC. (*Leguminosae-Mimosoideae*), relataram também que a região embrionária é constituída pelo eixo embrionário e as primeiras estruturas foliares. O eixo embrionário ocupa uma parte da região central da semente, assumindo posição axial, sendo composto por dois cotilédones verdes, planos e foliáceos que, unidos ao eixo embrionário, apresentam coloração amarelo-clara. A plúmula, situada na extremidade do eixo hipocótilo-radícula, mostra-se diferenciada e coberta de pêlos. Os primórdios foliares da plúmula são bem distinguíveis, com seus respectivos folíolos e foliólulos. O embrião é invaginado, com delimitação na base emarginada dos cotilédones ou pela invaginação do eixo nos cotilédones. Este tipo de embrião, segundo Damião Filho (1993), é muito encontrado na subfamília *Mimosoideae*.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os de Nascimento et al. (2007) que observaram, no citoplasma das células dos cotilédones de sementes germinadas de *Anadenanthera colubrina*, com 1,0 mm de comprimento de radícula, a presença de um material inespecífico, reagindo com o reativo de Schiff, com características globulares. Segundo relato dos autores, provavelmente, se trata de glicoproteínas e não amido, uma vez que a reação do lugol não foi positiva para este polissacarídeo. Esse resultado está de acordo com os obtidos neste trabalho para *A. colubrina*, uma vez que não foi detectada presença de amido nos cotilédones.

5.2 Composição química das sementes

O teor de fibra bruta e de taninos foi determinado em sementes intactas de *A. colubrina*, não tendo sido verificadas diferenças significativas para ambos os constituintes entre os lotes A e B, com os valores de $6,15 \pm 0,29\%$ e $5,62 \pm 0,16\%$ para fibra bruta e de $15,03 \pm 0,46\%$ e $18,03 \pm 0,93\%$ para taninos, para os lotes A e B, respectivamente.

Os demais constituintes que compõem a semente intacta, bem como, em separado, os cotilédones e o eixo embrionário de *A. colubrina*, encontram-se descritos na Tabela 1.

O grau de umidade foi menor no eixo embrionário de sementes do lote A quando comparado ao lote B, não diferindo estatisticamente entre semente intacta e cotilédones. Sementes do lote A apresentaram menor grau de umidade no eixo embrionário, sendo observado o contrário para sementes do lote B, uma vez que essas se encontram ainda imaturas.

Observou-se maior teor de extrato etéreo para o lote A em relação ao lote B. Com relação às partes das sementes dentro dos lotes, observou-se que os cotilédones contêm valor superior de extrato etéreo em relação ao eixo embrionário, para ambos os lotes. Os resultados encontrados foram superiores aos observados por Mayworm & Salatino (1996a, 1996b), para *A. colubrina* e *A. falcata*, que foram, respectivamente, de 3,1% e 2,1%. Esses autores relataram, ainda, o predomínio de ácidos graxos insaturados presentes em *A. colubrina*, destacando-se o ácido linoléico (C18:2) – 45,6% e o ácido oléico (C18:1) – 21,7%. Sasaki (2008) encontrou, para *Anadenanthera peregrina* var. *falcata*, teor de óleo de 6,97%. Valores bem superiores para o conteúdo de lipídios (50%) foram verificados em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (*Leguminosae-Caesalpinoideae*) (Corte et al., 2006).

Foi obtido percentual inferior de teor de amido para o eixo embrionário, em ambos os lotes de sementes. O baixo conteúdo de amido no eixo embrionário foi observado também quando se utilizou lugol para a sua detecção (Figura 2B). Os cotilédones oriundos das sementes coletadas no chão (lote A) apresentaram maior teor de amido em relação às sementes coletadas de frutos fechados (lote B).

Baixos teores de amido também foram relatados por Sasaki (2008), para *Anadenanthera peregrina* var. *falcata*, com média de 0,45%. Nascimento et al. (2007) observaram, para sementes secas de *Anadenanthera colubrina*, 1,9% de teor de amido.

Os carboidratos de reserva armazenados em sementes de leguminosas têm sido aplicados como ferramenta na taxonomia. Muitas *Papilionoideae* armazenam grandes quantidades de amido em suas sementes; em outras, sua ocorrência é pequena ou ausente. Em *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae*, essa reserva constitui uma exceção (Hegnauer & Gpayer-Barkmeijer, 1993). Corte et al. (2006) relataram a presença de menos de 4% de carboidratos em sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth.

Para o conteúdo de açúcares totais, valor superior foi obtido para cotilédones e eixo embrionário de sementes do lote A. Para o lote A, maior conteúdo de açúcares totais foi encontrado no eixo embrionário. No lote B, não foi verificada diferença entre o conteúdo presente nos cotilédones e no eixo embrionário.

Para o teor de açúcares redutores, verificou-se porcentagem superior nos cotilédones, em ambos os lotes de sementes, com maior acúmulo em sementes do lote A. Quanto à porcentagem de açúcares não redutores, maiores valores foram encontrados nas sementes do lote A e, dentro de cada lote, houve predomínio no eixo embrionário. O maior conteúdo de açúcares, tanto redutores quanto não redutores, ou a combinação de ambos, protege as sementes contra

danos à dessecação, sendo a aquisição de tolerância à dessecação adquirida com a maturação da semente.

De acordo com esses dados, os tecidos formados durante a maturação e tolerantes à dessecação são caracterizados por apresentarem alta quantidade de sacarose e oligossacarídeos (estaquiose ou rafinose) (Kuo et al., 1988) e por apresentarem ausência ou, pelo menos, baixa quantidade de monossacarídeos redutores, como a galactose, manose, glucose e frutose.

Para o teor de proteínas, houve interação significativa entre os lotes de sementes e as partes que compõem a semente. Verificaram-se teores menores para os cotilédones e o eixo embrionário em sementes do lote B. Dentro de cada lote de sementes, notou-se diferença significativa entre as partes da semente. Em ambos os lotes, verificaram-se maiores teores de proteína depositados nos cotilédones (Tabela 1).

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os descritos por Mayworm et al. (1998), para *Acacia bahiensis* Benth., *Acácia farnesiana* (L.) Wild e *Mimosa arenosa* (Winkl) Poir, todas pertencentes à subfamília *Mimosaceae*. Esses autores encontraram valores altos de proteínas, variando de 28% a 55%. Descreveram, ainda, para sementes de *Caesalpinia pyramidalis*, teor de proteínas de aproximadamente 40%.

Sasaki (2008), trabalhando com sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata*, encontrou teores médios de 8,73% de açúcar e 30,35% de proteína, semelhantes aos verificados neste trabalho. Os dados obtidos neste trabalho corroboram também com os relatados por Nascimento et al. (2007) para sementes de *Anadenanthera colubrina*, que verificaram a presença de 2,7% de glicose (açúcar solúvel) e 13,1% de proteína. Segundo Bewley & Black (1994), as proteínas são mobilizadas durante a germinação e o subsequente crescimento das plântulas.

Marques (1997) relatou, para sementes de *A. peregrina* var. *falcata* e *A. colubrina* var. *cebil*, valores de 31,6% e 33,4%, 17,5% e 17,4%, 6,06% e 6,81%, para proteína, amido e lipídio, respectivamente. Esses resultados, embora estejam relativamente diferentes dos obtidos neste trabalho, demonstram o alto conteúdo de proteína presente em sementes de angico.

Para o conteúdo de aminoácidos nas sementes de *A. colubrina*, observaram-se valores inferiores para o lote A em relação ao lote B. Para ambos os lotes, porcentagens superiores de aminoácidos foram observadas no eixo embrionário (Tabela 1).

De maneira geral, foram verificados, para *A. colubrina*, teores superiores de proteína, seguido de extrato etéreo e amido.

TABELA 1. Valores médios em base seca (desvio padrão) dos constituintes químicos da semente intacta, cotilédones e eixo embrionário de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, do lote A (sementes coletadas no chão) e lote B (sementes obtidas de frutos fechados). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Constituintes	Lotes	
	A	B
Grau de umidade (%)		
Semente intacta	11,81±0,49 aA	12,42±0,06 aB
Cotilédones	12,34±0,94 aA	13,00±0,19 aB
Eixo embrionário	9,47±0,76 bB	15,01±0,57 aA
CV (%) = 4,76		
Extrato etéreo (%)		
Semente intacta	15,96±0,19 aB	11,66±0,15 bB
Cotilédones	21,21±0,22 aA	18,38±0,36 bA
Eixo embrionário	8,46±0,00 aC	5,82±0,00 bC
CV (%) = 1,47		
Amido (%)		
Semente intacta	11,58±4,04 aB	12,79±4,27 aA
Cotilédones	16,32±5,83 aA	10,34±15,74 bB
Eixo embrionário	4,46±3,15 aC	4,50±5,03 aC
CV (%) = 8,77		
Açúcar total (%)		
Semente intacta	13,16±0,71 aC	12,44±0,86 aB
Cotilédones	18,21±0,29 aB	16,16±0,02 bA
Eixo embrionário	21,76±0,36 aA	16,13±0,52 bA
CV (%) = 1,97		
Açúcar redutor (%)		
Semente intacta	4,52±0,03 aB	3,55±0,08 bB
Cotilédones	4,98±0,03 bA	6,10±0,29 aA
Eixo embrionário	0,81±0,01 aC	0,64±0,03 bC
CV (%) = 0,73		
Açúcar não-redutor (%)		
Semente intacta	9,36±0,19 aC	7,96±0,05 bC
Cotilédones	12,80±0,02 aB	9,56±0,06 bB
Eixo embrionário	20,64±0,50 aA	14,83±0,24 bA
CV (%) = 3,65		
Proteína bruta (%)		
Semente intacta	42,15±0,21 aC	42,70±0,99 aA
Cotilédones	47,07±0,25 aA	43,40±0,00 bA
Eixo embrionário	44,45±0,49 aB	39,37±0,25 bB
CV (%) = 1,12		
Aminoácidos (µmol/g)		
Semente intacta	339,09±22,93 bB	526,58±69,43 aB
Cotilédones	288,30±32,55 bB	601,80±40,14 aB
Eixo embrionário	692,30±43,82 bA	969,15±71,69 aA
CV (%) = 8,80		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CV = coeficiente de variação.

Sementes recém-colhidas de *Acacia polyphylla* DC. (*Leguminosae-Mimosoideae*), segundo Araújo Neto et al. (2002), apresentaram altos teores de carboidratos totais (44 g), seguidos de proteínas (13,1%) e óleo (2,7%).

De acordo com Santos & Buckeridge (2004), a quantidade de reservas nos cotilédones de *A. falcata* é muito baixa, pois os cotilédones são foliáceos e se tornam fotossintetizantes após a germinação. Maciel et al. (1992) relataram que, para sementes de angico-vermelho, cotieira e jacarandá caviúna, os teores de fenóis totais nos embriões foram, de maneira geral, inferiores aos quantificados nos respectivos tegumentos, estando entre 0,016 e 0,495, para o embrião e 0,329 e 1,342, para o tegumento, dados em mg de equivalentes catecol/g de peso seco. Entre estas espécies, no tegumento de sementes de angico-vermelho constataram-se os menores níveis de fenóis totais.

Vallilo et al. (2001), estudando a composição química das sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl., pertencente à família *Leguminosae-Faboideae (Papilionoideae)*, revelaram que essas apresentaram altos teores de lipídios (26,8%), protídios (25,9%) e fibras alimentares (18,4%).

No entanto, para sementes de baru, também pertencente à família *Leguminosae*, Takemoto et al. (2001) encontraram elevados teores de lipídios (38,2%), proteínas (23,9%) e calorías (502kcal/100g), além de valores significativos de fibras alimentares (13,4%) e de minerais, como potássio (827 mg/100g), fósforo (358 mg/100g) e magnésio (178 mg/100g), sugerindo seu emprego na alimentação humana e animal, desde que não contenha substâncias tóxicas ou alergênicas.

É importante ressaltar que as sementes oleaginosas apresentam menor potencial de armazenamento que as amiláceas, devido à menor estabilidade química dos lipídios em relação ao amido; a temperatura necessária para a degradação do amido é mais elevada que a responsável pelos mesmos efeitos em

lipídios. Nessas sementes, uma elevação moderada da temperatura, como consequência do processo respiratório, é suficiente para a decomposição dos lipídios e a elevação da taxa de deterioração. Por esse motivo, as sementes oleaginosas devem ser armazenadas com grau de umidade inferior ao recomendado para as amiláceas. O teor elevado de proteínas também pode contribuir para a redução do potencial de armazenamento, devido à elevada afinidade dessa substância com a água (Marcos Filho, 2005).

A composição química é determinada, em última análise, pela herança genética. Algumas alterações de composição são induzidas por condições ambientais durante o desenvolvimento das sementes, mas tais mudanças são, geralmente, insignificantes (Bewley & Black, 1994). Proteínas, amido e lipídios são as principais formas de reservas nas sementes, sendo utilizados durante o desenvolvimento da plântula (Buckeridge et al., 2004).

5.3 Curva de embebição de sementes

A embebição foi realizada com sementes dos lotes A e B, por 48 horas, permitindo a construção da respectiva curva (Figura 5).

O ganho de massa deve-se à absorção de água e a curva de embebição das sementes de *A. colubrina* aproxima-se do padrão trifásico (Bewley & Black, 1994).

É provável que o tegumento das sementes de *A. colubrina* seja bastante permeável à água, pois, nos lotes A e B, a primeira fase (fase I) de embebição de água ocorreu durante as primeiras 7,67 horas e 5,57 horas, respectivamente (Figura 5). Nesta fase, surgem os primeiros sinais de reativação do metabolismo, com aumento acentuado da atividade respiratória e liberação de energia para a germinação, ativação de enzimas e síntese de proteínas a partir do RNAm armazenado ao final do processo de maturação (Bewley & Black, 1994).

Na fase II, o ganho de massa foi baixo e contínuo (Figura 5), sendo, provavelmente, induzido pelo potencial osmótico celular, pois o potencial matricial torna-se pouco relevante. A ausência de estabilização da massa indica que o potencial osmótico não foi completamente anulado pelo potencial de parede (Justo et al., 2007). Essa fase teve duração relativamente curta, ocorrendo com 17,83 horas e 20,14 horas, para os lotes A e B, respectivamente. Segundo Marcos Filho (2005), a fase II é caracterizada por atividades constituintes do processo bioquímico preparatório, sendo necessária para a síntese de enzimas, de DNA e de RNAm, exauridos durante a fase I.

O início da fase III, tornando visível a retomada de crescimento do embrião, foi identificado pela protrusão da raiz primária. Notou-se que o ganho de massa acelerou-se a partir de 19,41 horas e 25,70 horas, para os lotes A e B, respectivamente, correspondente ao início desta fase.

Os resultados obtidos para os diferentes lotes de sementes de *A. colubrina* não indicam a ocorrência de dormência para essa espécie, com o tegumento sendo permeável à água.

O mesmo foi relatado por Lopes (2007) para sementes escarificadas e não escarificadas de *Bauhinia variegata* var. *candida* e *Bauhinia forficata*. Esses autores evidenciaram que, durante o processo de embebição, sementes dessas espécies apresentaram aumento no peso de matéria fresca, indicando menores restrições à passagem de água através do tegumento e, conseqüentemente, menor dureza e impermeabilidade do mesmo à água.

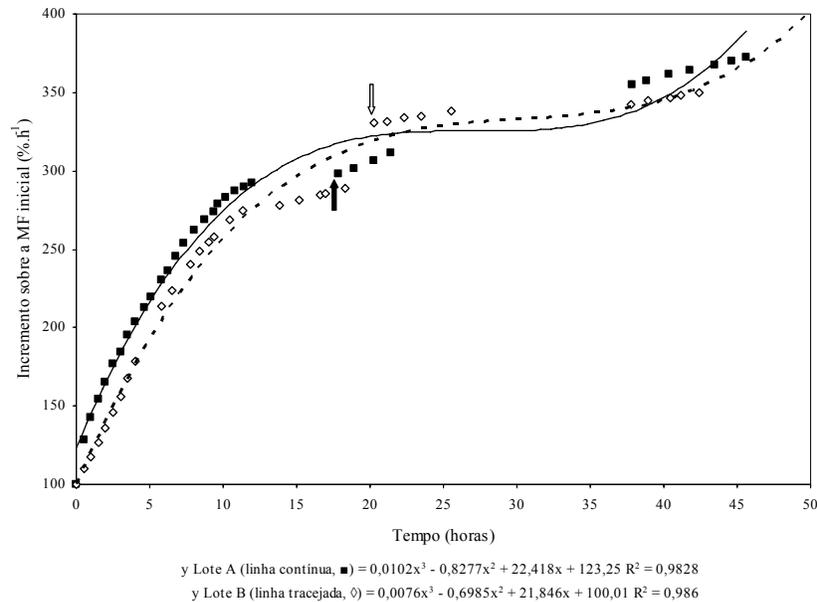


FIGURA 5. Incremento em relação à massa fresca inicial ($\% h^{-1}$) de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, do lote A (linha contínua) e do lote B (linha tracejada), ao longo do período de embebição (setas: 50% de sementes germinadas, com protrusão radicular \pm a 2,0 mm; seta cheia: lote A; seta vazia: lote B). UFLA, Lavras, MG, 2008.

A evolução do processo germinativo de sementes de *A. colubrina*, evidenciando a protrusão radicular até a formação da plântula, está ilustrada na Figura 6.

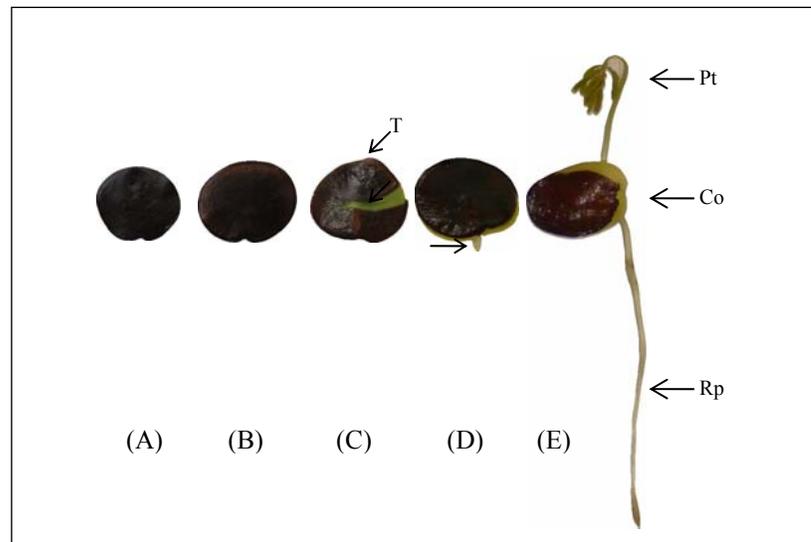


FIGURA 6. Evolução do processo germinativo de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, evidenciando a protrusão radicular (seta), até a formação da plântula. (A) semente seca; (B) 6 horas de embebição; (C) 12 horas de embebição, semente com tegumento rompido; (D) 16 horas de embebição e (E) 25 horas de embebição. (Pt: protófilos, C: cotilédones, Rp: raiz principal, T: tegumento). UFLA, Lavras, MG, 2008.

5.4 Efeito da temperatura e luminosidade na germinação de sementes

Não houve efeito significativo para a interação tripla entre lotes de sementes, condições de luminosidade e regimes térmicos para todas as variáveis analisadas (Tabela 2). A interação dupla significativa entre condições de luminosidade e temperatura foi verificada apenas para as porcentagens de plântulas normais e anormais (Tabela 3).

Com relação à germinação, a temperatura constante de 30°C e os regimes alternados de 15°C-25°C e 20°C-30°C proporcionaram maior percentual de germinação nas sementes do lote A, não havendo, contudo, efeito das condições de luminosidade. Nota-se que a temperatura de 25°C propiciou maior percentual de sementes mortas, em sementes do lote B (Tabela 2).

Quanto ao índice de velocidade de germinação (IVG), maior vigor foi verificado em sementes do lote A, a 30°C, independente da condição de luminosidade (Tabela 2).

TABELA 2. Valores médios de porcentagem de germinação (G, %), sementes mortas (M, %) e índice de velocidade de germinação (IVG) de dois lotes de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan submetidas a diferentes condições de luminosidade e regimes térmicos. UFLA, Lavras, MG, 2008.

	G (%)	M (%)	IVG
Lotes			
A	93 a	6 b	19,20 a
B	88 b	10 a	16,16 b
Luminosidade			
Presença	90 a	9 a	17,45 a
Ausência	91 a	7 a	17,91 a
Temperaturas (°C)			
25	81 b	17 a	17,16 b
30	96 a	6 b	20,59 a
15-25	91 a	6 b	17,84 b
20-30	93 a	3 b	15,12 c
CV (%)	6,28	40,83	9,33

*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, para cada fator e variável, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A maior porcentagem de plântulas normais foi verificada em sementes do lote A e o contrário para sementes do lote B (Tabela 3).

TABELA 3. Valores médios de porcentagem de plântulas normais (PN, %) e plântulas anormais (PA, %), de dois lotes de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, submetidas a diferentes condições de luminosidade e regimes térmicos. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Lotes	PN (%)	PA (%)
A	85 a	10 b
B	69 b	17 a
CV (%)	11,95	6,38

*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, para cada fator e variável, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Pelos dados obtidos para interação dupla entre as condições de luminosidade e temperatura, verificou-se que a porcentagem de plântulas normais foi superior nas temperaturas de 30°C na presença de luz, e a 20°C-30°C, na ausência de luz, não havendo diferenças significativas para os demais tratamentos. Para a porcentagem de plântulas anormais, menor valor foi observado na temperatura alternada de 20°C-30°C, não diferindo os demais tratamentos entre si (Tabela 4).

Comparando-se dentro de cada condição de luminosidade, quando as sementes foram submetidas à presença ou à ausência de luz, menor porcentagem de plântulas normais ocorreu à temperatura constante de 25°C (Tabela 4). Quanto à porcentagem de plântulas anormais, tanto na presença como na ausência de luz, a maior porcentagem foi observada a 25°C.

TABELA 4. Valores médios de porcentagem de plântulas normais e anormais para interação entre diferentes condições de luminosidade e regimes térmicos, em sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Temperaturas (°C)	Luminosidade	
	Presença	Ausência
	Plântulas normais (%)	
25	62 aB	55 aC
30	85 aA	75 bB
15-25	86 aA	87 aA
20-30	77 bA	88 aA
Plântulas anormais (%)		
25	20 aA	28 aA
30	7 aBC	8 aB
15-25	10 aC	5 aB
20-30	18 aAB	9 bB

*Médias seguidas por letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O aspecto visual da formação de plântulas normais e anormais de *A. colubrina* está ilustrado na Figura 7.

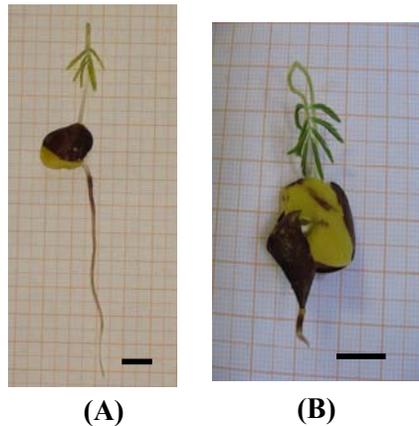


FIGURA 7. Aspecto visual de plântulas, normal (A) e anormal (com sistema radicular atrofiado) (B), obtidas de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Segundo Ramos & Varela (2003), a temperatura ideal de germinação, geralmente, varia dentro da faixa de temperatura encontrada no local e na época ideal para emergência e estabelecimento das plântulas. Varela et al. (2005), ao estudarem o efeito das temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C na germinação de sementes de angelim-pedra (*Dinizia excelsa* Benth), não verificaram efeito das mesmas, porém, a 30°C e 35°C, houve maior desenvolvimento do hipocótilo e da raiz primária.

Em estudos realizados em sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth), foi observado que a temperatura de 25°C proporcionou maior porcentagem de germinação e vigor das sementes, em comparação às temperaturas de 20°C, 30°C e alternância de 20°C-30°C (Alves et al., 2002).

Insensibilidade de sementes na germinação em relação à luz também foi demonstrada nos resultados de Perez et al. (2001), testando sementes de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). Passos et al. (2008) constataram que diferentes regimes de luz não influenciaram a germinação das sementes de *Cedrela odorata* L.

As informações obtidas concordam com as de Nassif et al. (1998), que citam a existência de sementes que podem ser influenciadas positiva ou negativamente pela luz ou, ainda, apresentar comportamento indiferente a ela. Resultados semelhantes foram observados por Ferraz Grande & Takaki (2006) que, ao estudarem sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth, concluíram que elas não possuem fotossensibilidade.

5.5 Efeito do substrato na germinação de sementes

Em rolo de papel, observou-se maior porcentagem de germinação (protrusão radicular) e de plântulas normais nas sementes provenientes do lote B em relação ao lote A. Para os demais substratos não houve diferenças

significativas entre os lotes (Tabela 5). Dentro do lote, menor valor foi obtido para o rolo de papel, para germinação (protrusão radicular) e plântulas normais. Dentro do lote B, não houve diferença significativa entre os substratos (Tabela 5).

Embora tenha sido detectada a presença do fungo patogênico *Fusarium verticillioides* no substrato sobre papel e de fungos saprófitas, como *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, esses não prejudicaram a germinação das sementes de *A. colubrina*. Segundo Strapasson et al. (2002), não foram encontrados relatos anteriores sobre a associação de fungos em sementes de angico, muito embora, em seu trabalho com angico (*Piptadenia paniculata* Bentham), os autores tenham encontrado a presença de fungos potencialmente patogênicos como *Fusarium*, *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Cladosporium* e *Alternaria*) e saprófitas (*Aspergillus*, *Pestalotia*, *Monilia*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Geotrichum*), em baixos percentuais de contaminação.

Quanto ao IVG, valor superior foi verificado para as sementes do lote A em comparação ao lote B, utilizando substratos areia e rolo de papel, não havendo diferenças entre os demais substratos para ambos os lotes. Dentro do lote A, maior vigor foi observado quando se utilizaram substratos sobre areia e, dentro do lote B, também em substrato areia e Plantmax® (Tabela 5).

TABELA 5. Valores médios de germinação (protrusão radicular) (%), índice de velocidade de germinação (IVG) e plântulas normais (%), para interação entre diferentes lotes e substratos, em sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Substratos	Lotes	
	A	B
Germinação (%)		
Rolo de papel	73 bB	94 aA
Sobre papel	95 aA	100 aA
Plantmax®	96 aA	94 aA
Sobre areia	97 aA	98 aA
CV (%) = 5,88		
IVG		
Rolo de papel	21,21 aAB	13,46 bB
Sobre papel	14,42 aC	14,00 aB
Plantmax®	17,47 aBC	19,58 aA
Sobre areia	22,79 aA	19,46 bA
CV (%) = 11,51		
Plântulas normais (%)		
Rolo de papel	67 bB	88 aA
Sobre papel	83 aA	88 aA
Plantmax®	94 aA	91 aA
Sobre areia	93 aA	96 aA
CV (%) = 8,35		

*Médias seguidas por letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para porcentagem de plântulas anormais e sementes mortas não foram verificadas interações significativas entre lotes de sementes e substratos testados. Maiores porcentagens de plântulas anormais e sementes mortas ocorreram em rolo de papel (Tabela 6).

TABELA 6. Valores médios de porcentagem de plântulas anormais (PA, %) e sementes mortas (M, %) de dois lotes de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, submetidos a diferentes substratos para o teste de germinação. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Substratos	PA (%)	M (%)
Rolo de papel	7 a	15 a
Sobre papel	0 b	2 b
Plantmax®	3 ab	4 b
Sobre areia	2 ab	2 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, as características comprimento da parte aérea, comprimento do sistema radicular e matéria seca do sistema radicular foram influenciadas pela interação dupla entre substratos e lotes de sementes.

Sementes do lote A, germinadas em rolo de papel e sobre areia, exibiram maior comprimento da parte aérea, ao contrário do que ocorreu com as plântulas provenientes de sementes germinadas dos demais substratos. Avaliando-se a mesma variável dentro do lote B, observou-se melhor comportamento das plântulas em substrato Plantmax®, provavelmente devido à constituição física desse substrato, que permite melhores condições de oxigenação às plantulas. Quando se compararam os lotes de sementes dentro de cada substrato, verificou-se maior comprimento da parte aérea em rolo de papel para o lote A e em Plantmax® para o lote B, não diferindo essa característica para os demais substratos (Tabela 7).

No que diz respeito ao crescimento do sistema radicular, dentro do lote A verificou-se maior comprimento em substratos rolo de papel e Plantmax®, e dentro do lote B, valor superior foi observado em Plantmax®. Na comparação dos lotes de sementes dentro de cada substrato, verifica-se que no rolo de papel

as sementes do lote A apresentaram maior comprimento de raiz que sementes do lote B, não havendo diferenças significativas para os demais tratamentos (Tabela 7).

Quanto à massa seca do sistema radicular, não houve diferença significativa entre os diferentes substratos para o lote A e, para o lote B, menor valor foi observado no rolo de papel, não diferindo os demais tratamentos entre si. Comparando-se os lotes de sementes dentro de cada substrato, verificou-se maior massa seca do sistema radicular para sementes do lote A em rolo de papel e para sementes do lote B em Plantmax®, não havendo diferenças entre os lotes de sementes dentro dos substratos sobre papel e areia (Tabela 7).

TABELA 7. Valores médios de comprimento (cm) de parte aérea (CPA), comprimento (cm) de sistema radicular (CSR) e massa seca (mg) do sistema radicular (MSSR) de plântulas normais de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, em diferentes substratos e lotes de sementes (A e B), após 10 dias do início da germinação. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Substratos	CPA		CSR		MSSR	
			Lotes			
	A	B	A	B	A	B
Rolo de papel	13,18 aA	11,27 abB	12,33 aA	7,63 bB	18,2 aA	7,7 bB
Sobre papel	9,92 bA	9,36 bA	7,20 bA	6,35 bA	15,6 aA	15,8 aA
Plantmax®	11,14 bB	12,69 aA	10,73 aA	11,28 aA	12,9 aB	17,4 aA
Sobre areia	9,56 bA	10,71 bA	6,48 bA	6,15 bA	14,8 aA	16,1 aA
CV (%)	38,25		63,78		82,62	

*Médias seguidas por letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada variável, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto à massa seca da parte aérea e sua respectiva relação com o sistema radicular, a interação dupla entre os lotes de sementes e diferentes substratos não foi significativa. Maior acúmulo de massa seca da parte aérea foi obtido nas plântulas germinadas em substrato Plantmax®, e menores valores em substrato sobre papel. A relação entre massa seca do sistema radicular e parte aérea foi maior em substrato sobre papel em relação aos demais substratos (Tabela 8 e Figura 8). Esse teste pode ser usado para se avaliar o crescimento da plântula e determinar, com maior precisão, a transferência de matéria seca dos tecidos de reserva para o eixo embrionário na fase de germinação, originando plântulas com maior peso, em função do maior acúmulo de massa seca (Nakagawa, 1999).

TABELA 8. Valores médios de matéria seca (mg) da parte aérea (MSPA) e relação de matéria seca do sistema radicular/parte aérea (MSSR/MSPA) de plântulas normais de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, em diferentes substratos, após 10 dias do início da germinação. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Substratos	MSPA	MSSR/MSPA
Rolo de papel	74,7 bc	0,1842 b
Sobre papel	72,2 c	0,2852 a
Plantmax®	104,9 a	0,1817 b
Sobre areia	101,3 ab	0,1758 b
CV (%)	91,70	92,52

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

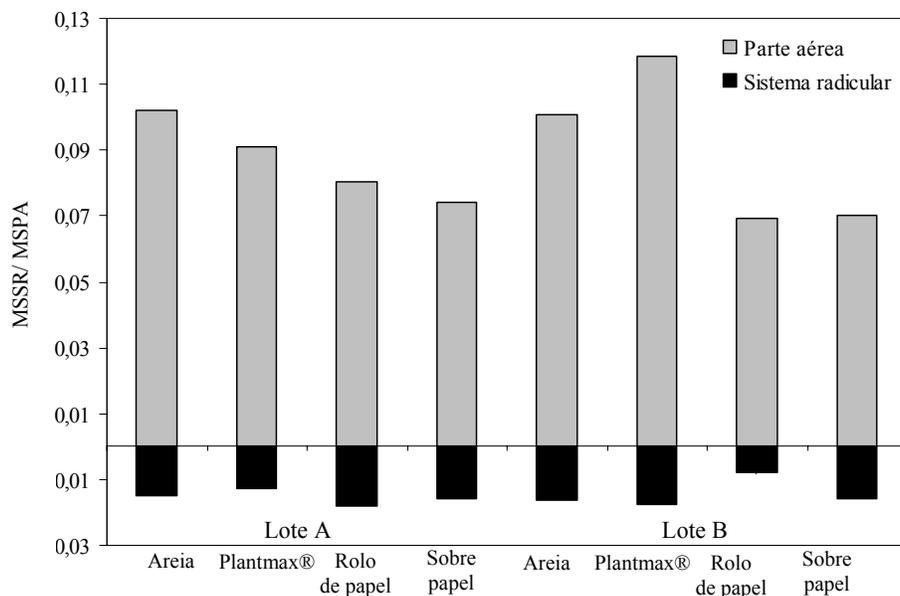


FIGURA 8. Massa seca de sistema radicular/massa seca de parte aérea (MSSR/MSPA) de plântulas normais de dois lotes de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, em diferentes substratos, após 10 dias do início da germinação. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Varela et al. (2005), estudando a germinação de sementes de *Acosmium Nitens* (Vog.) Yakovlev (*Leguminosae-Caesalpinoideae*), relataram que o substrato papel de filtro mostrou-se prejudicial para a germinação das sementes, sendo essa nula em temperaturas de 30°C e 35°C. No entanto, quando se utilizou temperatura de 30°C juntamente com o substrato vermiculita, obtiveram-se alta taxa de germinação das sementes (97%) e menor tempo médio de germinação (5 dias). Para o substrato areia, as temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C

proporcionaram maiores porcentagens de germinação, comparadas à temperatura de 35°C.

Passos et al. (2007) estudaram o efeito do substrato sobre a germinação de sementes de *Mimosa caesalpinifolia* Benth e observaram que não ocorreram diferenças entre os substratos papel de filtro, areia e algodão, ressaltando-se que os mesmos apresentaram, em média, 80% de germinação. Em substrato vermiculita, a germinação foi de 52%. Maior índice de velocidade de germinação foi obtido com o uso do substrato algodão, resultado que pode ser atribuído ao fato de o mesmo reter mais umidade. Segundo Figliolia et al. (1993), o uso da vermiculita mostrou-se inadequado para sementes de *M. caesalpinifolia*. Os autores descrevem, ainda, que sementes dessa espécie são indiferentes à luz durante a germinação, sendo esse último resultado semelhante ao obtido neste trabalho para sementes de *A. colubrina*.

Kissmann et al. (2008) desenvolveram trabalhos com o objetivo de avaliar a temperatura e os substratos ideais para a germinação de sementes de *Adenantha pavonina* L.. Estes autores observaram maiores valores de germinação nos substratos sobre papel e em rolo de papel, em média de 86%, não sendo observada diferença significativa no peso seco das plântulas, em média de 1,08 g, submetidas a diferentes temperaturas e substratos.

Amaro et al. (2006) estudaram a influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.) e verificaram que as sementes apresentam fotoblastismo neutro; as temperaturas de 20°C e 25°C, combinadas com escuro constante e luz/escuro, e as temperaturas de 30°C e 20°C-35°C, combinadas com luz/escuro, são as condições mais favoráveis à germinação. A combinação das temperaturas de 25°C e 30°C e a ausência de luz aumentam a velocidade e reduzem o tempo médio de germinação de sementes dessa espécie.

De acordo com Barbosa (1980; 2003), as sementes de *A. colubrina* var. *cebil* têm rápida germinação, são fotoblásticas neutras, com faixa ótima de temperatura entre 30°C a 40°C, com 98% a 100% de germinação. Em campo, Barbosa (1980) conseguiu 70% a 75% de germinação após sete dias de observação.

Melo et al. (2005) avaliaram o efeito de diferentes substratos na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan em condições de laboratório e observaram que a maior porcentagem de germinação de sementes ocorreu nos substratos entre areia e vermiculita, à temperatura de 30°C e fotoperíodo de 12 horas. Constataram também que o substrato entre papel Germitest® apresentou o pior desempenho, com o menor número de sementes germinadas e o maior de plântulas anormais. Esses autores relataram que, embora todos os substratos utilizados possuam uma característica em comum, a de restrição parcial da incidência de luz sobre as sementes, a diferença pode ser explicada pela baixa termocondutividade do papel Germitest®, o que fez com que o percentual germinativo deste tratamento fosse significativamente inferior, quando comparado aos outros.

Resultados obtidos neste trabalho para *A. colubrina* corroboram os encontrados por Novembre et al. (2007) para *sansão-do-campo* (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. – *Fabaceae - Mimosoideae*), em que a condição mais favorável para o teste de germinação das sementes foi a temperatura de 30°C, com o uso dos substratos papel ou vermiculita. O mesmo foi relatado por Mendonça et al. (2008) para sementes de *sacambu* (*Platymiscium floribundum* Vog.- *Papilionoideae*), cujo substrato de papel na forma de rolo favoreceu a germinação de sementes e a formação de plântulas normais, nas temperaturas constantes de 25°C, 30°C e 35°C.

6 CONCLUSÕES

A anatomia seminal de *A. colubrina* é típica das leguminosas, especialmente considerando-se a subfamília *Mimosoideae*. O número de sementes por fruto é, em média, de 10 e o peso de mil sementes varia de 117 g a 120 g.

A composição química das sementes se caracteriza pela presença de elevados teores de proteína, seguidos de extrato etéreo e baixo conteúdo de amido.

Sementes de *A. colubrina* não apresentam dormência tegumentar.

A maior porcentagem de germinação ocorre a 30°C, 15°C-25°C e 20°C-30°C, sendo as sementes indiferentes à luz e o maior vigor verificado a 30°C.

A temperatura de 25°C constante contribui para o aumento substancial do porcentual de plântulas anormais e de sementes mortas, tanto na ausência como na presença de luz.

Os substratos areia e Plantmax® são eficientes na avaliação do desenvolvimento de plântulas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA, 2004. 51 p.

ALVES, E.U. **Maturação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.)**. 2002. 95 p. Tese (Doutorado em Produção e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

AMARO, M. S.; FILHO, S. M., GUIMARÃES, R. M., TEÓFILO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 450-457, maio/jun. 2006.

AÑEZ, L. M. M.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; DOMBROSKI, J. L. D. Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Müll. Arg. (*Euphorbiaceae*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 563-568, jul./set. 2005.

ARAÚJO NETO, J. C.; AGUIAR, I. B.; FERREIRA, V. M.; PAULA, R. C. Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 24, n. 1, p. 203-211, 2002.

ARAÚJO NETO, J.C.; AGUIAR, I. B.; FERREIRA, V. M. Efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de *Acacia polyphylla* DC. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 249-256, jun. 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. **Methods of the association of official analytical chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 684 p.

AUSTRALIA. Minister of Agriculture, Fisheries and Forestry. **Lista de espécies com importação não permitida**. 2007. Disponível on line em: <http://www.daffa.gov.au/__data/assets/pdf_file/0019/25444/non-permitted_species.pdf> Acesso em: 21 fev. 2007.

BARBOSA, D. C. A. Estratégias de germinação e crescimento de espécies lenhosas da caatinga com germinação rápida. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. p. 625-656.

BARBOSA, D. C. A. **Estudos ecofisiológicos em *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan – aspectos de germinação e crescimento**. 1980. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Role of temperature and light in the germination ecology of buried seeds of weedy species of disturbed forests. I. *Labelia inflata*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n. 3, p. 589-592, Mar. 1992.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BORGES, I. F.; NETO, J. D. G.; BILIA, D. A. C.; RIBEIRO, R. de C. L. F.; BARBEDO, C. J. Maturation of Seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an Endangered Leguminous Tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 851-861, Nov./Dec. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: NAD/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

CANDIANI, G. **Regeneração natural em áreas anteriormente ocupadas por floresta de *Eucalyptus saligna* Smith. no município de Caieiras (SP):** subsídios para recuperação florestal. 2006. 118 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

CHAVES, L. de L. B.; CARNEIRO, J. G. de A.; BARROSO, D. G. Crescimento de mudas de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan (angico-vermelho) em substrato fertilizado e inoculado com rizóbio. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 6, p. 911-919, nov./dez. 2006.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. de A. L.; VENTRELLA, M. C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (*Leguminosae-Caesalpinioideae*). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 6, p. 941-949, nov./dez. 2006.

CRUZ, E. D.; MARTINS, F. O.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke, *Leguminosae - Caesalpinioideae*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n. 2, p. 161-165, abr./jun. 2001.

DAMIÃO-FILHO, C. F. **Morfologia vegetal**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. 243 p.

ESPINOZA, E. R. Desiccation and storage of *Anadenanthera colubrina* seeds. In: STORAGE biology of tropical tree seeds. BASFOR: Centro de Semillas Forestales. 2004.

FENNER, M. **Seed ecology**. London: Chapman & Hall, 1993.

FERRAZ GRANDE, F. G. A.; TAKAKI, M. Efeitos da luz, temperatura e estresse de água na germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (*Caesalpinioideae*). **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 37-42, 2006.

FERREIRA, D. F. **SISVAR- Sistema de análise de variância para dados balanceados**: versão 4.6. Lavras: UFLA, 2003.

FIGLIOLIA, M. B.; OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Análise de Sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F.; FIGLIOLA, M. B. (Org.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. 350 p.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, p. 371-382, 1963.

GUNN, C. R. Fruits and seeds of genera in the subfamily *Mimosoideae* (Fabaceae). Technical Bulletin United States Department of Agriculture, Washington, n. 1681, p. 1-194, 1984.

HEGNAUER, R.; GPAYER-BARKMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 3-16, Jan. 1993.

JUSTO, C. F.; ALVARENGA, A. A. de; NERY, F. C.; FILHO, N. D. Composição química, curva de embebição e efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de *Eugenia pyriformis* Camb. (*Myrtaceae*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 510-512, 2007.

KARNOVISKY, M.J.A. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 27, n. 2, p. 137A-138A, 1965.

KISSMANN, C.; SCALON, S. de P. Q.; FILHO, H. S., RIBEIRO, N. Tratamentos para quebra de dormência, temperaturas e substratos na germinação de *Adenantha pavonina* L. **Ciência e Agrotécologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 668-674, 2008.

LABOURIAU, L. G.; MARQUES, I. F.; LABOURIAU, M. L. S.; HANDRO, W. Nota sobre a germinação de sementes de plantas de cerrados em condições naturais. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 227-237, jul./set. 1963.

LOPES, J. C.; BARBOSA, L.G., CAPUCHO, M.T. Germinação de sementes de *Bauhinia* spp. **Floresta**, Curitiba, v. 37, n. 2, 2007.

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

MACIEL, A. S.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G. Determinação da presença de fenóis em sementes de espécies florestais e sua relação com inibidores de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 1-4, 1992.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination- aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MAYWORM, M. A. S., SALATINO, A. Fatty Acid Composition of 'Cerrado' Seed Oils. **Journal Science and Food Agriculture**, London, v. 72, n. 2, p. 226-230, Oct. 2006.

MAYWORM, M. A. S., SALATINO, A. Teores de óleo e composição de ácidos graxos de sementes de *Cereus jamacaru* DC. (Cactaceae), *Zizyphus joazeiro* (Benth) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) von Altschul. (Mimosaceae). **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 15, p. 201-209, 1996.

MAYWORM, M. A. S.; NASCIMENTO, A. S. do; SALATINO, A. Seeds of species from the caatinga: proteins, oils and fatty acid contents. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84041998000300009&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 09 July 2008. doi: 10.1590/S0100-84041998000300009

MENDONÇA, E. A. F. de; CERVI, F.; ALBUQUERQUE, M. C. de F. **Germinação de sementes de sacambu (*Platymiscium floribundum* Vog.-*Papilionoideae*) em diferentes substratos e temperaturas**. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/agtrop/revista8/doc/09.doc>>. Acesso em: 27 jul. 2008.

MELO, R. R. de; FERREIRA, A. G.; JUNIOR, F. R. Efeito de diferentes substratos na germinação de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) em condições de laboratório. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, n. 5, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/florestal>>.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.24.

NASCIMENTO, P. L.; MESQUITA, J. de M.; BRITO, E. S.; GALLÃO, M. I. Mobilização de reservas das sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) após a germinação. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 966-968, 2007.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNADES, G. D. (LARGEA/). Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes. Piracicaba: IPEF/LCF/ESALQ/USP, **Informativo Sementes IPEF**, Abr. 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/sementes/>>. Acesso em: 07 ago. 2006.

NELSON, N. A. Photometric adaptation of somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, n. 1, p. 375-384, 1944.

NOVEMBRE, A. D. L. C.; FARIA, T. C.; PINTO, D. H. V.; CHAMMA, H. M. C. P. Teste de germinação de sementes de sansão-do-campo (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. – *Fabaceae-Mimosoideae*). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n. 3, p. 47-51, dez. 2007.

OLIVEIRA, D. M. T. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 413-427, jul./set. 1999.

OLIVEIRA, E. C. Morfologia de plântulas florestais. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes Florestais Tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p. 175-214.

PASSOS, M. A.; TAVARES, K. M. P.; ALVES, A. R. Germinação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 1, p. 51-56, 2007.

PASSOS, M. A. A.; SILVA, F. J. B. C.; SILVA, E. C. A. PESSOA, M. M. L.; SANTOS, R. C. Luz, substrato e temperatura na germinação de sementes de cedro-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 281-284, fev. 2008.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência da luz na germinação de sementes de canafístula submetidas ao estresses hídrico. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 3, p. 155-166, 2001.

RAMOS, M. B. P.; VARELA, V. P. Efeito da temperatura e do substrato sobre a germinação de sementes de visgueiro do igapó (*Parkia discolor* Benth) *Leguminosae, Mimosoideae*. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém. n. 39, p. 123-133, 2003.

RODRIGUES, A. P. D'A. C.; LAURA, V. A.; CHERMOUTH, K. S.; GADUM, J. Absorção de água por semente de salsa, em duas temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 30, n. 1, p. 49-54, 2008.

SANTOS, H. P.; BUCKERIDGE, M. S. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenocallis courbaril* under different light conditions. **Annals of Botany**, London, n. 6, 12 p. Dec. 2004.

SASAKI, M. **Lipídios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do cerrado**. 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, M. A. P. da, FILHO, S. M. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 3, p. 320-325, 2006.

STRAPASSON, M.; SANTOS, A. F. dos; MEDEIROS, A. C. S. Fungos associados às sementes de angico (*Piptadenia paniculata*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 45, p. 137-141, jul./dez. 2002.

TAKEMOTO, E.; OKADA, I. A.; GARBELOTTI, M. L.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 113-117, jul./dez. 2001.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S.; GARBELOTTI, M. L. Caracterização química parcial das sementes de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 17-22, jan./jun. 2001.

VANDE KAMER, S. B.; VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, July/Aug. 1952.

VARELA, V. P.; COSTA, S. S.; RAMOS, M. B. P. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de itaubarana (*Acosmium nitens* (Vog.) Yakovlev) - *Leguminosae*, *Caesalpinoideae*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 35-39, mar. 2005.

VILELA, E. A.; RAMALHO, M. A. P. Análise das temperaturas e precipitações pluviométricas de Lavras, Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 71-79, jan./jun. 1979.

YEMM, E. W.; COOKING, E. C. The determination of amino acids with ninhidrin. **Analyst**, Cambridge, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by Antrone. **Biochemistry Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

CAPÍTULO III

ASPECTOS DA GERMINAÇÃO *in vitro* DE EIXOS EMBRIONÁRIOS, INDUÇÃO DE BROTAÇÕES E CALOGÊNESE EM EXPLANTES DE

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan

1 RESUMO

NERY, Fernanda Carlota. Aspectos da germinação *in vitro* de eixos embrionários, indução de brotações e calogênese em explantes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. In: _____. **Germinação, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho** (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan). 2008. Cap. 3, p. 87-158. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. *

Objetivou-se estudar a germinação *in vitro* de eixos embrionários, a indução de brotações e a calogênese em explantes de *A. colubrina*. Foram testados diferentes tempos de exposição ao hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo) e paraformaldeído na desinfestação de eixos embrionários. A germinação *in vitro* de eixos embrionários foi avaliada quanto aos efeitos de diferentes concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹), BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e meios de cultura (MS e WPM). Para a obtenção de brotações, segmentos caulinares provenientes de plântulas *in vitro* foram inoculados em meio WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹), 30,0g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de ágar. O pH foi corrigido para 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura média de 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹. Para o enraizamento das brotações, o meio de cultura WPM foi suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 7,0 g L⁻¹ de ágar, 0,1% de carvão ativado e diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 5,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹) e caseína hidrolisada (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 g L⁻¹). Foram testadas concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L⁻¹) na indução de calogênese a partir de segmentos foliares, caulinares, cotiledonares e eixos embrionários. Para a aclimatização das plântulas, essas foram transferidas para tubetes contendo Plantmax®, procedendo-se o estudo anatômico de folíolos. O uso de paraformaldeído por 120 minutos é eficiente na desinfestação de eixos embrionários. Todos os meios de cultura testados são eficientes para a germinação *in vitro* de eixos embrionários, no entanto, é obtida baixa taxa de sobrevivência *ex vitro*. A utilização de BAP promove resposta eficiente na indução de brotações. O AIB e a caseína hidrolisada nas concentrações testadas não induzem a rizogênese em brotações. Na ausência de 2,4-D, a calogênese é ausente. Segmentos caulinares, foliares e embrionários são explantes ideais para a indução de calogênese.

* Comitê Orientador: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Orientador), Renato Paiva, PhD – UFLA, José Márcio Rocha Faria, PhD – UFLA, Dr^a Cristina Filomena Justo – UFMT (Co-orientadores).

2 ABSTRACT

NERY, Fernanda Carlota. Aspects of *in vitro* germination of embryonic axes, shoots induction and callus formation in explants of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. In: _____. **Germination, *in vitro* cultivation and freezing tolerance of red angico seeds** (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan). Chap. 3, p. 87-158. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

It was aimed to study the *in vitro* germination of embryonic axes, the shoots induction and callus formation in explants of *A. colubrina*. It was tested different periods of exposition to sodium hypochlorite (2,0% of active chlorine) and Paraformaldehyde in the desinfestation of embryonic axes. The *in vitro* germination of embryonic axes was evaluated for the effects of different concentrations of GA₃ (0.0; 2.0; 4.0; 6.0 and 8.0 mg L⁻¹), BAP (0.0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹) and culture medium (MS and WPM). To obtain shoots, stem segments from *in vitro* plants were inoculated in WPM medium, supplemented with different concentrations of BAP (0.0; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 and 10.0 mg L⁻¹) and NAA (0.0; 0.01; 0.1 and 1.0 mg L⁻¹), 30.0g L⁻¹ of sucrose and 7.0 g L⁻¹ of agar. The pH was adjusted to 5.8. After inoculation, the explants were kept in growth room with an average temperature of 25 ± 2°C, photoperiod of 16 h and irradiance of 36 μmol m⁻² s⁻¹. For the shoots rooting the culture medium WPM was supplemented with 30.0 g L⁻¹ of sucrose, 7.0 g L⁻¹ of agar, 0.1% of activated charcoal and different concentrations of IBA (0.0; 1.0; 2.0; 5.0; 8.0 and 10.0 mg L⁻¹) and hydrolyzed casein (0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 g L⁻¹). It was tested concentrations of 2,4-D (0.0; 1.0; 5.0; 10.0; 20.0 and 40.0 mg L⁻¹) in the callus induction from leaves segments, cotyledons and embryonic axes. For the seedlings acclimatization, they were transferred to tubes containing Plantmax®, following the anatomical studies of the leaflets. The use of Paraformaldehyde during 120 minutes is effective to the embryonic axes desinfestation. All the culture medium tested are efficient to the *in vitro* germination of embryonic axes, however it is verified a low *ex vitro* surviving rate. The use of BAP promotes an effective response of shoots induction. The IBA and hydrolyzed casein in the concentrations tested, did not induced the shoots rooting. In the absence of 2,4-D, did not occurred the callus formation. Stem, leaves and embryonic segments are ideal to induce callus formation.

* Adviser Comitee: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Adviser), Renato Paiva, PhD – UFLA, José Márcio Rocha Faria, PhD – UFLA, Dr^a Cristina Filomena Justo – UFMT (Co-advisers).

3 INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais consiste de um conjunto de técnicas por meio das quais um explante é isolado e cultivado sob condições assépticas, em um meio nutritivo artificial (Pasqual et al., 1998). Essas técnicas podem ser importantes ferramentas para uma rápida e eficiente propagação de espécies, dentre elas a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, pertencente à subfamília *Mimosoideae* (*Fabaceae*), conhecida popularmente como angico-vermelho.

A micropropagação vem sendo utilizada na produção em escala comercial para a obtenção de mudas uniformes e sadias em curto espaço de tempo. Contudo, a aplicação em larga escala da propagação *in vitro* ainda é limitada para a maioria das espécies lenhosas de interesse econômico, por apresentar sérios problemas, como contaminação, oxidação do meio de cultura, baixa taxa de enraizamento (Jordan, 1988), multiplicação dos brotos e abscisão foliar provocada pelo acúmulo de etileno (Rasai et al., 1994; Zobayed et al., 2002; Nepomuceno et al., 2007).

A germinação de sementes *in vitro* tem sido utilizada como técnica de suporte aos processos de micropropagação, sem perda da variabilidade genética (Gomes, 2007). Embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este são quase autotróficos. Em geral, dependendo da espécie, não há a necessidade de suplementação de fonte de energia, uma vez que os embriões podem germinar e crescer num meio inorgânico, em que os reguladores de crescimento se tornam dispensáveis (Hu & Ferreira, 1998, Ledo et al., 2007).

Segundo Ferreira (2000), a falta de informações básicas sobre espécies nativas dificulta o andamento de pesquisas que visam à conservação das espécies e à multiplicação *in vitro*. A inclusão das espécies nativas em programas de conservação ainda é limitada e ajustes de protocolos envolvendo a

composição dos meios de cultura, até fatores físicos, como temperatura e luminosidade, são fundamentais para o favorecimento da germinação *in vitro* (Gomes, 2007).

Para que a plântula formada a partir da germinação *in vitro* possa ser fonte confiável de explantes, os métodos de desinfestação devem ser eficazes, proporcionando total ausência de agentes patológicos (Nascimento et al., 2007). Diversas substâncias com ação germicida podem ser utilizadas para desinfestação, tais como cloreto de mercúrio, peróxido de hidrogênio, mertiolate, nitrato de prata e etanol, bem como compostos à base de cloro, como hipoclorito de sódio (NaOCl) e de cálcio. São necessários estudos sobre agentes de desinfestação para diminuir os custos e o impacto ambiental do laboratório de cultivo vegetal *in vitro* (Fior et al., 2005).

O paraformaldeído (H-CHO)_n, utilizado na desinfestação, é um polímero sólido do formaldeído comercializado em drágeas, que o liberam em forma gasosa. O gás (H-CHO) é incolor, caústico para pele e mucosas e possui um odor característico, mesmo em mínimas concentrações. Sob temperatura ambiente, a liberação do paraformaldeído é menor, requerendo níveis térmicos elevados para ampliar o efeito esterilizante (Graziano et al., 1989). Segundo Fior et al. (2000), poucos são os trabalhos que relacionam o emprego do paraformaldeído no cultivo de tecidos vegetais.

O metabolismo do nitrogênio está envolvido nos processos fisiológicos e bioquímicos associados ao controle de crescimento, diferenciação e morfogênese, sendo o N um nutriente de grande importância para a maioria das espécies cultivadas *in vitro*. A caseína hidrolisada é uma das principais fontes de suplementação deste elemento no cultivo *in vitro* de orquídeas, cana-de-açúcar e cravo (Vieira et al., 2007). Segundo De Lucca (2003), a qualidade da cultura é afetada consideravelmente na ausência de caseína hidrolisada, reduzindo a

capacidade regenerativa da planta, quando empregada na indução e na multiplicação de calos embriogênicos somáticos de milho.

Sistemas de cultura de calos e células vegetais representam uma fonte potencial de valiosos metabólitos medicinais, flavorizantes, essências e corantes que não podem ser produzidos por células microbianas ou por síntese química. Todavia, atualmente, poucas culturas produzem esses compostos em quantidades úteis comercialmente, sendo necessários estudos sobre a indução de calos, visando trabalhos futuros na ativação de moléculas secundárias *in vitro* (Pereira et al., 2007).

A capacidade de indução da desdiferenciação celular é uma das mais importantes características exploradas no cultivo *in vitro* das plantas. A indução de calos em explantes de *A. colubrina* poderá ser utilizada para definir uma rota de multiplicação pela via embriogênica ou morfogênica, visando à sua conservação, à semelhança do que se tem verificado com outras lenhosas (Jain et al., 1998). A maximização da produção de calos regenerativos requer a consideração de vários fatores, como a composição do meio de cultura, a escolha do tipo de explante e as condições de ambiente de cultivo. Para a proliferação de calos e a indução de células para qualquer rota morfogenética, é necessária a utilização de reguladores de crescimento, que atuem na retomada mitótica de tecidos diferenciados (Sondahl et al., 1985). Dentre as auxinas, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) tem sido reportado como regulador de crescimento sintético mais adequado à indução e à manutenção de calos, para as mais diversas espécies vegetais cultivadas *in vitro* (Gamborg et al., 1976; Nascimento et al., 2007).

O aprimoramento do protocolo de germinação *in vitro* e o ajuste de uma metodologia de multiplicação de plântulas permitirão elevar os percentuais de plântulas emergidas, viabilizando a produção de mudas. Esta iniciativa pode ser expandida para várias espécies endêmicas e ou ameaçadas de extinção, nas quais

se detecte a necessidade de formas complementares de propagação, de modo a garantir a conservação dos recursos florestais.

Nesse contexto, objetivou-se, com a realização deste trabalho, estudar alguns aspectos da germinação *in vitro* de eixos embrionários e a indução de brotações e calogênese em explantes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foram coletadas no chão, na época da dispersão, de agosto a setembro de 2007, em, aproximadamente, 50 árvores matrizes localizadas no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes foram armazenadas em câmara fria (8°C e 45%UR), em embalagens de polietileno, no Laboratório de Sementes Florestais, no Departamento de Ciências Florestais (UFLA). Em seguida, os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos, Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia (UFLA).

4.2 Efeito do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaOCl) e a drágeas de paraformaldeído na desinfestação de eixos embrionários

Após a excisão do eixo embrionário das sementes de *A. colubrina*, esses foram submetidos a testes de desinfestação.

O procedimento padrão de desinfestação constituiu-se de imersão em etanol 70%, por 30 segundos, seguida de imersão em NaOCl (água sanitária da

marca Qboa, com 2,0% a 2,5% de cloro ativo) em diferentes tempos, 5, 10 e 15 minutos. Posteriormente, os eixos embrionários foram lavados três vezes em água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar.

A desinfestação com paraformaldeído foi realizada à temperatura ambiente ($\pm 26^{\circ}\text{C}$), mantendo-se os eixos embrionários em placas de Petri de 7 cm, estéreis e lacradas, com duas drágeas de 500 mg de paraformaldeído 80% procedente da empresa Anteres Química e Farmacéutica Ltda. Foram testados diferentes intervalos de tempos de exposição, de 5, 30, 60 e 120 minutos.

Na seqüência aos tratamentos, os eixos embrionários foram imediatamente inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com metade da concentração dos sais, suplementado com $30,0 \text{ g L}^{-1}$ de sacarose. O meio foi solidificado com ágar $4,0 \text{ g L}^{-1}$ e o pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C e pressão de 1,0 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os eixos embrionários foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação foi realizada após 10 dias de incubação, sendo contabilizado o número de eixos embrionários contaminados, oxidados e germinados, tendo como critério de germinação a formação de plântulas normais, com parte aérea e sistema radicular completamente desenvolvidos.

Os resultados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um eixo embrionário.

Foi utilizada a metodologia de modelos lineares generalizados por meio da *procedure* GENMOD do pacote estatístico SAS® (1999). Os dados caracterizaram-se por apresentarem distribuição binomial (presença ou ausência da característica,) sendo utilizada, como função de ligação, a função logística (η), dada por:

$$\eta = \ln\left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i}\right) = \beta_1 + \beta_2 tempo_i$$

Foram utilizados dois modelos de regressão logística quando se avalia a presença ou a ausência de contaminação, sendo a equação (1) para os dados referentes ao uso de drágeas de paraformaldeído e a equação (2), para o uso de NaOCl.

O modelo logístico para o uso de paraformaldeído foi dado por:

$$\mu_i = \frac{e^{\eta_i}}{1 + e^{\eta_i}} = \frac{e^{1,1543 - 0,0342 tempo}}{1 + e^{1,1543 - 0,0342 tempo}} \text{ (equação 1)}$$

O modelo logístico para o NaOCl foi dado por:

$$\mu_i = \frac{e^{\eta_i}}{1 + e^{\eta_i}} = \frac{e^{25,2186 - 5,3210 tempo}}{1 + e^{25,2186 - 5,3210 tempo}} \text{ (equação 2)}$$

Para a ocorrência de oxidação dos eixos embrionários pelo uso de NaOCl, a proporção de oxidação foi dada pelo modelo exposto na equação 3:

$$\mu_i = \frac{e^{\eta_i}}{1 + e^{\eta_i}} = \frac{e^{4,1091 - 0,2626 tempo}}{1 + e^{4,1091 - 0,2626 tempo}} \text{ (equação 3)}$$

4.3 Germinação *in vitro* de eixos embrionários

4.3.1 Efeito de GA₃ e meios de cultura

Os eixos embrionários foram desinfestados por 120 minutos, em placas de Petri lacradas, contendo duas drágeas de paraformaldeído e inoculados em tubos de ensaio contendo os diferentes tratamentos.

Foram testadas concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹), em meios de cultura MS e WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementadas com

3,0% de sacarose e solidificadas com ágar 0,4%. O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C e pressão de 1,0 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os eixos embrionários foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada aos 35 dias de incubação, sendo observada a porcentagem de germinação. Como critério de germinação, considerou-se a protrusão radicular com ±2,0 mm.

A formação de plântulas obtida de eixos embrionários germinados *in vitro* em diferentes concentrações de GA₃ foi avaliada observando-se as seguintes características: comprimento da raiz principal, número de raízes secundárias, formação de calos na raiz, comprimento da parte aérea, número de brotações, comprimento da maior brotação, número de gemas e abscisão foliar, em cada tratamento.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições, em que os tratamentos constituíram-se de dois meios de cultura (MS e WPM) e diferentes concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). Para as características comprimento da raiz principal, número de raízes secundárias, formação de calos na raiz, comprimento da parte aérea, número de brotações, comprimento da maior brotação e número de gemas, foi utilizada a metodologia de modelos lineares generalizados com o *procedure* GENMOD do pacote estatístico SAS® (1999).

Os dados de ocorrência de abscisão foliar e formação de calos na raiz caracterizaram-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica), tendo sido utilizada, como função de ligação, a função logística (η), dada por:

$$\eta = \ln \left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i} \right)$$

Pela análise de Deviance para proporção de abscisão foliar em plântulas *in vitro* crescidas nos meios de cultura MS e WPM, obtiveram-se, respectivamente, os seguintes modelos:

$$\text{. para o meio de cultura MS: } \mu_i = \frac{e^{\eta_i}}{1 + e^{\eta_i}} = \frac{e^{-0,2385 - 0,0564 \text{concentração}}}{1 + e^{-0,2385 - 0,0564 \text{concentração}}};$$

$$\text{. para o meio de cultura WPM: } \mu_i = \frac{e^{\eta_i}}{1 + e^{\eta_i}} = \frac{e^{-1,4679 + 0,2817 \text{concentração}}}{1 + e^{-1,4679 + 0,2817 \text{concentração}}}.$$

No que diz respeito à formação de calos em raiz de plântulas *in vitro* na presença de diferentes concentrações de GA₃, foi utilizado, independente do meio de cultura utilizado, o seguinte modelo logístico:

$$\mu = \frac{e^{\eta}}{1 + e^{\eta}} = \frac{e^{-0,2835 - 0,4308 \text{concentração}}}{1 + e^{-0,2835 - 0,4308 \text{concentração}}}$$

Os dados de número de raízes secundárias, número de brotações e número de gemas caracterizaram-se por apresentar distribuição de Poisson (contagem), sendo utilizada, como função de ligação, a função logarítmica (η), dada por:

$$\eta = \ln(\mu_i)$$

Obteve-se, para o meio de cultura MS, o seguinte modelo modelo log-linear, para o número de raízes secundárias:

$$\mu = e^{\eta} = e^{2,2971 - 0,4834 \text{concentração} + 0,0485 \text{concentração}^2}$$

Para a contagem média de número de brotações formadas em plântulas *in vitro*, obtiveram-se, para os meios MS e WPM, os seguintes modelos:

Para o meio MS, o modelo log-linear foi dado por:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{-1,0980 - 1,5407 \text{concentração} + 0,6938 \text{concentração}^2 - 0,0771 \text{concentração}^3}$$

Para o meio WPM, o modelo log-linear foi dado por:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{-0,6589 + 0,9324 \text{concentração} - 0,3451 \text{concentração}^2 + 0,0295 \text{concentração}^3}$$

No que diz respeito ao número de gemas formadas em plântulas *in vitro*, foram obtidos os seguintes modelos:

. para o meio MS:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{0,0645-3,0941\text{concentração}+1,4582\text{concentração}^2-0,1648\text{concentração}^3};$$

. para o meio WPM:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{1,2482+0,2711\text{concentração}-0,1179\text{concentração}^2+0,0104\text{concentração}^3}.$$

Os dados de comprimento da raiz principal e comprimento de parte aérea foram ajustados a um modelo paramétrico segundo um delineamento inteiramente casualizado com diferentes números de repetições por tratamento. Os tratamentos foram arrançados em um esquema fatorial 2 x 5 (2 meios de cultura e 5 concentrações de GA₃). O modelo estatístico que descreve as observações foi dado por:

$$y_{ijk} = \mu + m_i + c_j + mc_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésimo meio de cultura e j-ésima concentração de GA₃, com $k = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

m_i é o efeito do i-ésimo meio de cultura, com $i = 1, 2$;

c_j é o efeito da j-ésima concentração de GA₃, com $j = 1, \dots, 5$;

mc_{ij} é o efeito da interação entre o i-ésimo meio de cultura e a j-ésima concentração de GA₃;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Os dados de comprimento da maior brotação foram ajustados a um modelo paramétrico segundo um delineamento inteiramente casualizado com

diferentes números de repetições por tratamento. Os tratamentos foram arranjados em um esquema hierárquico, em que as concentrações de GA₃ estavam hierarquizadas nos meio de cultura. O modelo estatístico que descreve as observações foi dado por:

$$y_{ijk} = \mu + m_i + c_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésimo meio de cultura e j-ésima concentração de GA₃, com $k = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

m_i é o efeito do i-ésimo meio de cultura, com $i = 1, 2$;

$c_{j(i)}$ é o efeito da j-ésima concentração de GA₃ dentro do i-ésimo meio de cultura, com $j = 1, \dots, J$;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

4.3.2 Efeito de BAP e meios de cultura

Os eixos embrionários foram desinfestados por 120 minutos, em placas de Petri lacradas, contendo duas drágeas de paraformaldeído e inoculados em tubos de ensaio contendo os diferentes tratamentos.

Foram testadas concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e os meios de cultura MS e WPM, suplementados com 30,0 g L⁻¹ de sacarose e solidificados com ágar 4,0 g L⁻¹. O pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C e pressão de 1,0 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os eixos embrionários foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada aos 35 dias de incubação,

sendo observada a porcentagem de germinação. Como critério de germinação, considerou-se a protrusão radicular com $\pm 2,0$ mm.

A formação de plântulas obtidas de eixos embrionários germinados *in vitro* em diferentes concentrações de BAP foi avaliada observando-se as seguintes características: comprimento da raiz principal, número de raízes secundárias, formação de calos na raiz, comprimento da parte aérea, número de brotações, comprimento da maior brotação, número de gemas e abscisão foliar, em cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um tubo de ensaio e cada tubo contendo um eixo embrionário.

Para as variáveis: número de gemas, número de brotações, abscisão foliar e formação de calos na raiz, foram utilizadas as metodologias de modelos lineares generalizados com o *procedure* GENMOD do pacote estatístico SAS® (1999).

Para o número de brotações, obteve-se o seguinte modelo, independente do meio de cultura:

$$\mu = e^{\eta} = e^{-0,5870+0,6918\text{concentração}-0,1494\text{concentração}^2}$$

Os dados de abscisão foliar e formação de calos na raiz caracterizaram-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica), sendo utilizada, como função de ligação, a função logística (η), dada por:

$$\eta = \ln\left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i}\right)$$

Para as diferentes concentrações de BAP em meio MS, obteve-se, para a formação de calos, o seguinte modelo logístico:

$$\mu = \frac{e^{\eta}}{1 + e^{\eta}} = \frac{e^{-2,6395+2,7791\text{concentração}-0,4736\text{concentração}^2}}{1 + e^{-2,6395+2,7791\text{concentração}-0,4736\text{concentração}^2}}$$

Os dados de número de gemas e número de brotações caracterizaram-se por apresentar distribuição de Poisson (contagem), sendo utilizada, como função de ligação, a função logarítmica (η), dada por:

$$\eta = \ln(\mu_i)$$

A análise de Deviance para o número de gemas mostra, para os meios de cultura MS e WPM, os seguintes modelos log-lineares:

Para o meio MS:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{-0,2126+3,5287\text{concentração}-1,9764\text{concentração}^2+0,2917\text{concentração}^3}$$

E para o meio WPM:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{1,2512+0,3195\text{concentração}-0,0894\text{concentração}^2}$$

Os dados de comprimento da raiz principal, comprimento de parte aérea e comprimento da maior brotação foram ajustados por modelos paramétricos segundo um delineamento inteiramente casualizado com diferentes números de repetições por tratamento. Os tratamentos estavam arrançados em um esquema fatorial 2 x 5 (2 meios de cultura e 5 concentrações de BAP). O modelo estatístico que descreve as observações foi dado por:

$$y_{ijk} = \mu + m_i + c_j + mc_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésimo meio de cultura e j-ésima concentração de BAP, com $k = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

m_i é o efeito do i-ésimo meio de cultura, com $i = 1, 2$;

c_j é o efeito da j-ésima concentração de BAP, com $j = 1, \dots, 5$;

mc_{ij} é o efeito da interação entre o i-ésimo meio de cultura e a j-ésima concentração de BAP;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

4.4 Efeito do BAP e ANA na indução de brotações

Segmentos nodais de plântulas de *A. colubrina* obtidas da germinação *in vitro* de eixos embrionários, em meio MS, foram utilizados como fonte de explantes.

Segmentos nodais contendo até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹). Foram utilizados 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 6,0 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C e pressão de 1,0 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos foram vedados com tampas e filmes plásticos e mantidos em sala de crescimento, a 25±2°C, irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. A avaliação foi realizada aos 30 dias após a inoculação, considerando-se as seguintes características: número de brotações e gemas por explante, comprimento da maior brotação e presença de calos na base dos explantes.

Os resultados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

Com relação ao número de brotações e gemas produzidas, ajustaram-se modelos log-lineares, cujas equações descrevem a resposta média de cada variável analisada.

A análise de Deviance revelou que os dados de número de brotações por segmento nodal seguem os seguintes modelos log-lineares:

Em função das concentrações de BAP:

$$\mu = e^{\eta} = e^{-0,9493+0,5114BAP-0,0852BAP^2+0,0038BAP^3}$$

e em função das concentrações de ANA:

$$\mu = e^{\eta} = e^{-0,1400-1,3889ANA}$$

Pela análise de Deviance para o número de gemas por segmento nodal, obtiveram-se os seguintes modelos log-lineares, em função das concentrações de BAP:

.para a concentração 0,0 mg L⁻¹ de ANA:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{-0,2970+1,0780BAP-0,1741BAP^2+0,0075BAP^3} ;$$

. para a concentração 0,01 mg L⁻¹ de ANA:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{0,4754+0,6280BAP-0,1588BAP^2+0,0093BAP^3} ;$$

.para a concentração 0,1 mg L⁻¹ de ANA:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{0,1846+1,0904BAP-0,2883BAP^2+0,0182BAP^3} ;$$

.para a concentração 1,0 mg L⁻¹ de ANA:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{0,0604-0,0551BAP-0,0365BAP^2+0,0035BAP^3}$$

Para o número de gemas por explantes, em função das concentrações de ANA, foram obtidos os seguintes modelos log-lineares:

.para a concentração 0,0 mgL⁻¹ de BAP:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{-0,3320+1,9432ANA-2,3053ANA^2} ;$$

.para a concentração 1,0 mgL⁻¹ de BAP:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{1,1103+0,0178ANA-0,3863ANA^2} ;$$

.para a concentração 2,0 mgL⁻¹ de BAP:

$$\mu_i = e^{\eta_i} = e^{1,1054+5,1184ANA-6,9170ANA^2} ;$$

para a concentração 4,0 mgL⁻¹ de BAP:

$$\mu_i = e^{n_i} = e^{1,4083-8,4752ANA+5,4642ANA^2};$$

para a concentração 8,0 mgL⁻¹ de BAP:

$$\mu_i = e^{n_i} = e^{0,8415-7,0438ANA+5,8467ANA^2};$$

para a concentração 10,0 mgL⁻¹ de BAP:

$$\mu_i = e^{n_i} = e^{0,3543-1,1739ANA-0,0958ANA^2}.$$

No que diz respeito à presença de calos na base dos explantes, e por ser a variável de interesse dicotômica, apresentaram-se dois possíveis resultados (SIM/NÃO) e realizou-se o ajuste de um modelo de regressão logística. A qualidade dos modelos foi estimada via teste qui-quadrado de Person e análise de Deviance (Balakrishnan, 1992), respectivamente.

O modelo logístico utilizado para a análise estatística da proporção de formação de calos na base dos explantes foi dado pela equação abaixo, em função das concentrações de BAP:

$$\mu = \frac{e^{\eta}}{1 + e^{\eta}} = \frac{e^{0,4402+1,0007BAP}}{1 + e^{0,4402+1,0007BAP}}$$

Para a proporção de formação de calos na base do explante, em função das concentrações de ANA, foi obtido o seguinte modelo logístico:

$$\mu = \frac{e^{\eta}}{1 + e^{\eta}} = \frac{e^{1,4702+8,5806ANA}}{1 + e^{1,4702+8,5806ANA}}$$

Com relação ao comprimento da maior brotação, foi feito o ajuste de um modelo paramétrico segundo um delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos em esquema fatorial 6 x 4 (6 concentrações de BAP e 4 concentrações de ANA). O modelo estatístico que descreveu os dados foi o seguinte:

$$y_{ijk} = \mu + B_i + A_j + BA_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição, i-ésima concentração de BAP e j-ésima concentração de ANA;

μ é uma constante inerente a cada observação;

B_i é o efeito da i-ésima concentração de BAP, com $i = 1, \dots, 6$;

A_j é o efeito da j-ésima concentração de ANA, com $j = 1, \dots, 4$;

BA_{ij} é o efeito da interação entre a i-ésima concentração de BAP e j-ésima concentração de ANA;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

4.5 Efeito do 2,4-D na indução de calos em diferentes explantes

Plântulas oriundas da germinação *in vitro* de eixos embrionários de *A. colubrina* serviram como fonte de explantes caulinares e foliares para este experimento. Foram utilizados, ainda, explantes cotiledonares e eixos embrionários obtidos de sementes de *A. colubrina*.

Como protocolo de desinfestação dos cotilédones e eixos embrionários, foram utilizadas placas de Petri contendo duas drágeas de 500 mg paraformaldeído 80%, por um tempo de exposição de 120 minutos.

Segmentos foliares, caulinares e cotiledonares, com área de 1,0 cm² e eixos embrionários foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L⁻¹) e 30,0 g L⁻¹ de sacarose. Os meios foram solidificados com 6,0 g L⁻¹ de ágar e o pH foi

corrigido para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C e pressão de 1,0 atm, por 20 minutos.

Apenas nos segmentos cotiledonares foram efetuados cortes nas superfícies adaxial e abaxial dos explantes. A incubação foi realizada no escuro, sob temperatura de 25±2°C.

A avaliação (visual) foi realizada 30 dias após a inoculação, observando-se a percentagem da área dos explantes ocupada por calos nos diferentes tratamentos.

Os resultados foram analisados utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio, contendo um explante. Para uma melhor visualização dos resultados e para comparar quais tratamentos diferiram entre si, foi utilizada a construção de gráficos do tipo Box-Plot, segundo recomendação de Bussab & Morettin (1987).

4.6 Efeito do AIB e da caseína hidrolisada no enraizamento *in vitro* de brotações

Brotações obtidas de segmentos nodais de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, após um período de 30 dias em meio de cultura MS sem a presença de fitorreguladores, foram inoculadas em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 5,0; 8,0 e 10,0mg L⁻¹) e caseína hidrolisada (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g L⁻¹), e suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado. O meio foi solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar e seu pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C e pressão de 1,0 atm, por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25±2°C e na ausência de luz, por 15 dias. Decorrido esse

período, foram transferidos para meio de cultura MS, com metade da concentração dos sais, sem reguladores de crescimento e ausência de carvão ativado. Trinta dias depois, a formação de raízes nos diferentes tratamentos foi avaliada. Foram utilizadas 12 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio, contendo uma brotação.

4.7 Aclimatização de plântulas de *A. colubrina*

Plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro* de eixos embrionários de *A. colubrina*, com 45 dias de idade, foram transferidas diretamente para tubetes contendo 250 mL de Plantmax®, envoltas com embalagem plástica transparente, para a manutenção da umidade relativa no ambiente. As embalagens plásticas tiveram suas pontas cortadas em intervalos de 7 dias, até a completa remoção aos 21 dias. Os tubetes foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura controlada de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plântulas foram regadas, de acordo com a necessidade, com meio líquido MS, com metade das concentrações dos sais.

Aos 30 dias, foi realizada a avaliação de sobrevivência das plântulas. Os resultados foram analisados seguindo o delineamento inteiramente casualizado com 30 repetições, sendo cada repetição composta por um tubete contendo uma plântula.

4.8 Anatomia foliar em plântulas *in vitro*

Os estudos anatômicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal no Departamento de Biologia (UFLA), a partir de plântulas cultivadas em meios de cultura MS. Foliolos completamente expandidos, localizados na região mediana do terço superior das plântulas cultivadas *in vitro*, foram

coletados e fixados em álcool etílico 70% (v/v), segundo Johansen (1940). Em seguida, foi realizada a clarificação dos cortes em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v do produto comercial), por um período de cinco minutos, seguida de três lavagens em água destilada. A coloração dos cortes anatômicos foi efetuada utilizando-se uma mistura de azul de astra e safranina na proporção de 7:3, segundo os métodos descritos por Kraus & Arduin (1997). Posteriormente, foram preparadas lâminas semipermanentes em água glicerinada (1:1), lutadas com esmalte sintético.

As seções paradérmicas foram montadas entre lâmina e lamínula, diretamente com a solução corante (safranina 1% em água glicerinada) e observadas em microscópio Olympus CBB com auxílio de câmara clara, com documentação fotográfica realizada utilizando-se máquina digital Cânon®, para as avaliações da densidade estomática e medições dos diâmetros polar e equatorial, segundo técnica de Laboriau et al. (1961).

As medições de densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos foram realizadas seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com 25 repetições. Cada repetição foi composta por três medidas para a densidade estomática e diâmetros polar e equatorial dos estômatos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaOCl) e a drágeas de paraformaldeído na desinfestação de eixos embrionários

Houve diferença significativa quando se avaliou a proporção de contaminação dos eixos embrionários inoculados *in vitro*. Essa diferença

também foi verificada em função do tempo de exposição do eixo embrionário aos agentes desinfestantes (Anexo 1A).

Os modelos ajustados com as estimativas das proporções de contaminação dos eixos embrionários, quando da utilização de NaOCl e presença de drágeas de paraformaldeído, estão apresentados na Figura 1.

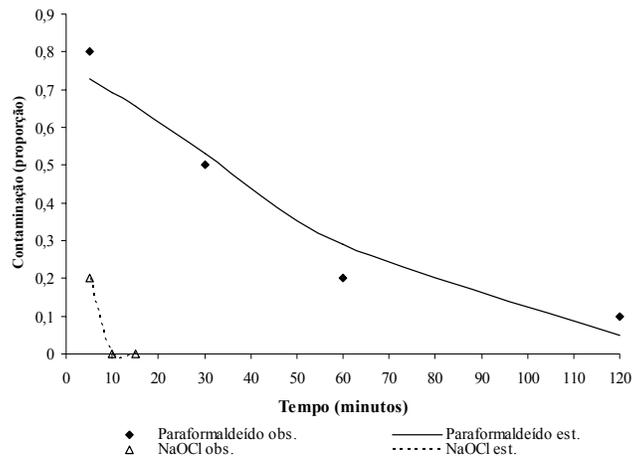


FIGURA 1. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo logístico para a probabilidade de contaminação com o uso NaOCl e paraformaldeído, ao longo do tempo de exposição do eixo embrionário a cada desinfestante. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Quando se avaliou a ocorrência de oxidação dos eixos embrionários na presença de paraformaldeído, notou-se uma resposta nula em todos os tempos de exposição testados. Os modelos ajustados com as estimativas das proporções de oxidação dos eixos embrionários, quando da utilização de NaOCl, são mostrados na Figura 2. Pôde-se observar que quanto maior foi o tempo de exposição do eixo embrionário ao NaOCl, maior foi a proporção de oxidação do material.

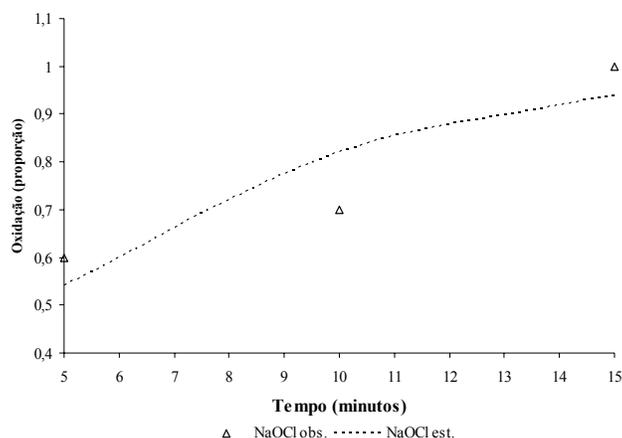


FIGURA 2. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo logístico quando quando foi utilizado NaOCl na desinfestação de eixos embrionários, ao longo do tempo de exposição. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Avaliou-se, ainda, a germinação dos eixos embrionários, tendo como critério a formação de plântulas normais. A produção média de plântulas normais foi de 82%, quando se utilizou paraformaldeído na desinfestação de eixos embrionários. Quando foi utilizado NaOCl como desinfestante, não foi observada nenhuma formação de plântulas normais, ou seja, 100% de ocorrência de plântulas anormais. Essas respostas não diferiram ao longo do tempo de exposição em cada desinfestante testado.

Resultados contrários aos obtidos neste trabalho foram relatados por Fior et al. (2005) que constataram que a incidência de oxidação aumentou com o tempo de exposição de segmentos nodais de *Limonium platyphyllum* Lincz. ao paraformaldeído, tendo sido observado 42% de explantes oxidados, com tempo de exposição de 20 horas. Esses mesmos autores relataram que as prováveis

causas dessa oxidação poderiam ser o efeito prejudicial do tempo prolongado de exposição ao paraformaldeído e a desidratação do tecido.

Por outro lado, Fior et al. (2001) relataram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para *A. colubrina*. Os autores verificaram que o uso do paraformaldeído, por duas horas em *Limonium platyphyllum* Lincz., eliminou a contaminação por fungos, porém, interferiu na regeneração de brotações do material *in vitro*. Entretanto, Borges et al. (2005) relataram, ao comparar esses mesmos agentes de desinfestação (NaOCl e paraformaldeído), que esse último, no tempo de exposição de duas horas, causou menores danos genéticos a sementes de cebola.

Santos (2005) também relata que o uso de NaOCl, apesar de mostrar-se eficiente, promove oxidação nos explantes de *Cariocar brasiliense* Camb. Kikuchi et al. (2001), utilizando NaOCl a 2%, por 10 ou 20 minutos, constataram a morte dos explantes de camu-camu. O efeito fitotóxico de NaOCl também foi relatado por Nery et al. (2008), que relataram que o uso desse desinfestante retarda o processo de germinação *ex vitro* de sementes de ipê-amarelo.

Os aspectos visuais da formação de plântulas normais e anormais obtidas a partir da germinação *in vitro* de eixos embrionários desinfestados com NaOCl e paraformaldeído estão representados na Figura 3.

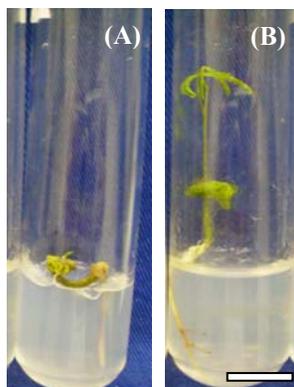


FIGURA 3. Germinação *in vitro* de eixos embrionários de *A. colubrina* submetidos à desinfestação com NaOCl (A) e paraformaldeído (B), aos 10 dias de cultivo. Barra = 1,0 cm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A formação de uma plântula normal, porém com presença de contaminação fúngica, pode ser visualizada na Figura 4.

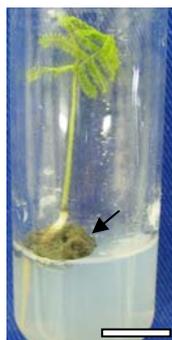


FIGURA 4. Plântula normal com presença de contaminação fúngica, obtida a partir da germinação *in vitro* de eixo embrionário de *A. colubrina* submetido à desinfestação com paraformaldeído por 30 minutos, aos 10 dias de cultivo. Barra = 1,0 cm (seta: fungos). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o uso de paraformaldeído como desinfestante, por 120 minutos, pode reduzir em até 70% a probabilidade de contaminação do eixo embrionário inoculado *in vitro*. Entretanto, este agente desinfestante não tem ação efetiva sobre contaminantes endógenos. O uso de NaOCl, embora tenha sido eficiente no controle da contaminação dos eixos embrionários *in vitro*, na concentração e no tempo de desinfestação utilizados, prejudica a formação de plântulas normais, por promover a oxidação dos eixos embrionários.

Observa-se, pelos resultados obtidos, que a ação do paraformaldeído é dependente do tempo de exposição, confirmando observações de Alasri et al. (1992, 1993) em atividades antimicrobianas. Segundo Fior et al. (2005), o paraformaldeído pode ser empregado como agente de desinfestação em protocolos de micropropagação, também como alternativa aos procedimentos que requerem imersão, como segmentos nodais.

Alvarez Pardo et al. (2006) observaram, ainda, que, para várias espécies de orquídeas brasileiras, os tratamentos de desinfestação com solução de NaOCl 0,4% ou 0,8% de cloro, por cinco minutos, ou por vapores de formol ou NaOCl por até duas horas foram eficientes no controle da contaminação fúngica em sementes. Esses autores sugerem, ainda, que esses procedimentos podem ser usados rotineiramente.

As drágeas de paraformaldeído têm baixo preço, podem ser reaproveitadas, são de manipulação fácil e segura, além de poderem substituir com vantagens as soluções de desinfestação, principalmente na produção de plantas *in vitro* em escala comercial. Porém, o emprego rotineiro do paraformaldeído no laboratório de cultivo *in vitro* requer adaptações estruturais que reduzam a exposição ocupacional humana a níveis mínimos, de preferência bem inferiores aos estabelecidos pelo Ministério da Saúde e pela *Occupational*

Safety & Health Administration (0,5 a 2,0 ppm) (Graziano et al., 1989; Fior et al., 2005).

5.2 Germinação *in vitro* de eixos embrionários

5.2.1 Efeito de GA₃ e meios de cultura

A porcentagem de germinação avaliada pela protrusão radicular a $\pm 2,0$ mm, de eixos embrionários de *A. colubrina*, não apresentou diferenças, considerando-se os diferentes meios de cultura e concentrações de GA₃ testados. Os valores mantiveram-se constantes, em média, 100%.

Conceição (2000), testando diferentes concentrações do meio MS na germinação de sementes de timbó (*Derris urucu*), também não encontrou efeito; fato semelhante constatado por Soares (2005), em mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

Para a variável comprimento da raiz principal formada, verificou-se efeito significativo da interação entre os meios de cultura e as concentrações de GA₃ testadas ($p=0,0009$) (Anexo 2A).

Para a característica comprimento da raiz principal das plântulas cultivadas *in vitro*, realizou-se análise de regressão para as diferentes concentrações de GA₃, cujos dados constam na Figura 5. Observou-se redução desta característica em meio MS acrescido de até 6,0 mg L⁻¹ de GA₃, enquanto, para as plântulas *in vitro* crescidas em meio WPM, não houve efeito, apresentando valor médio de 3,27cm, independente da concentração de GA₃ testada.

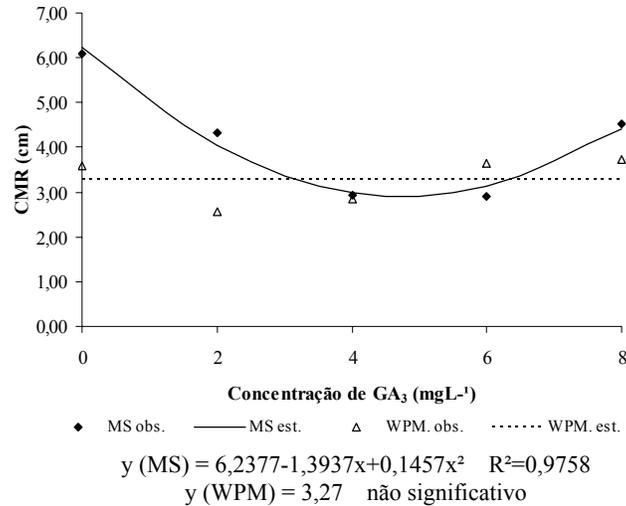


FIGURA 5. Valores observados (obs.) e estimados (est.) do comprimento da maior raiz (CMR), para os meios de cultura (MS e WPM), em função das concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹) em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os valores médios observados e estimados, para número de raízes secundárias formadas em plântulas *in vitro*, crescidos em meio MS, acrescidos de diferentes concentrações de GA₃, estão representados na Figura 6.

À medida que aumentou a concentração de GA₃ no meio de cultivo, observou-se redução em número de raízes secundárias. Não foi verificado efeito desse fitorregulador sobre o número de raízes secundárias formadas, com a utilização do meio de cultura WPM (Anexo 3A).

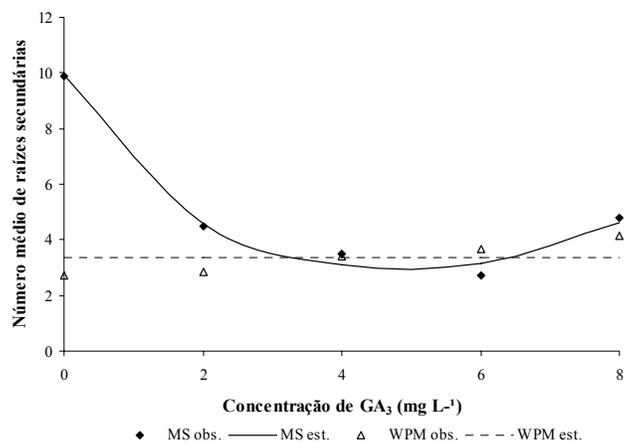


FIGURA 6. Valores observados (obs.) e estimados (est.), para o número de raízes secundárias formadas em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM), em função das concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹), segundo o modelo log-linear. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os valores médios, observados e estimados, de proporção para formação de calos na raiz de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, na presença de GA₃, estão representados na Figura 7. Observou-se que concentrações mais elevadas de GA₃ reduzem a formação de calos na raiz, em ambos os meios de cultura testados (Anexo 4A).

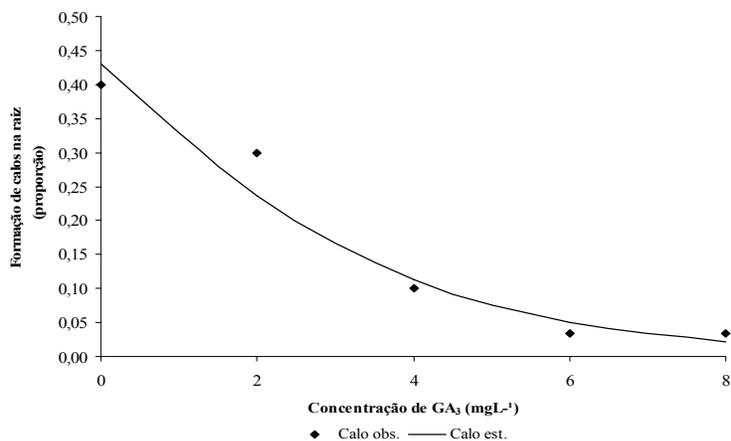


FIGURA 7. Valores médios, observados (obs.) e estimados (est.), para a proporção de formação de calos na raiz de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em função das concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹), segundo o modelo logístico. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Quanto ao crescimento da parte aérea de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, verifica-se, no Anexo 5A, que não houve efeito entre os meios de cultura e concentrações de GA₃ testados, isoladamente ou interagidos ($p > 0,05$). Os valores médios de comprimento de parte aérea de plântulas *in vitro* em função dos meios de cultura são relatados na Tabela 1.

Observou-se um desenvolvimento balanceado da parte aérea e do sistema radicular das plântulas de *A. colubrina*, em todos os tratamentos. Segundo Peres & Kerbauy (2000), o equilíbrio no desenvolvimento entre caule e raízes é vantajoso, considerando que ambos possuem funções complementares na sobrevivência geral das plantas.

TABELA 1. Valores médios, originais e transformados, de comprimento de parte aérea (cm) de plântulas *in vitro*, em função dos diferentes meios de cultura (MS e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de cultura	Médias originais (erro padrão)	Médias transformadas (erro-padrão)
MS	1,85 (0,18)	1,29 (0,05)
WPM	1,71 (0,20)	1,25 (0,06)

A ausência do efeito de GA₃, neste trabalho, para o comprimento de parte aérea, pode estar associado ao fato de que este foi esterilizado por autoclavagem, o que pode ter causado diminuição na sua concentração. Segundo Caldas et al. (1990), algumas substâncias orgânicas, como o GA₃, são degradadas pelo calor e precisam ser esterilizadas em filtros especiais tipo Milipore. O mesmo efeito não significativo para o uso de GA₃ foi observado por Rodrigues et al. (2007) na propagação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl.

Pela análise de Deviance representada no Anexo 6A, verifica-se interação significativa entre os meios de cultura e concentrações de GA₃ para o número de brotações em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*.

Os valores médios, observados e estimados da contagem de número de brotações formadas em plântulas *in vitro*, para os meios MS e WPM, em função das concentrações, estão representados na Figura 8. Notam-se oscilações em número de brotações de plântulas *in vitro*, para os diferentes meios de cultura e diferentes concentrações de GA₃ testadas, com maiores valores obtidos no meio WPM.

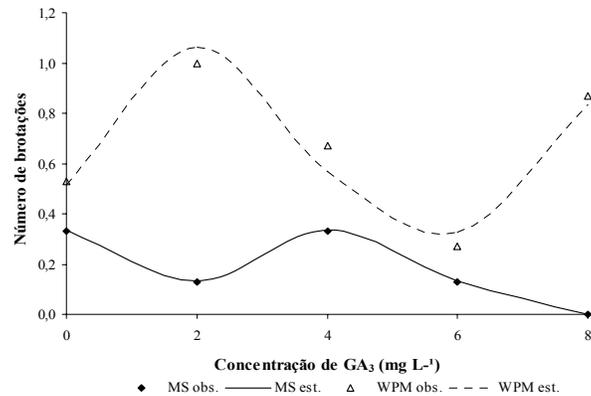


FIGURA 8. Valores observados (obs.) e estimados (est.), para a contagem de número de brotações formadas em plântulas *in vitro*, em função das diferentes concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹), para os meios de cultura MS e WPM, segundo o modelo log-linear. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Pelos dados do Anexo 7A, nota-se que houve efeito significativo dos meios de cultura (MS e WPM) ($p=0,0030$) sobre o comprimento da maior brotação em plântulas *in vitro*, independente da concentração de GA₃. Os valores médios de comprimento da maior brotação em função dos meios de cultura são relatados na Tabela 2. As brotações de plântulas *in vitro* foram maiores em comprimento, quando se utilizou o meio de cultura WPM.

TABELA 2. Valores médios, originais e transformados, de comprimento da maior brotação (cm) de plântulas *in vitro*, em função dos meios de cultura (MS e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de cultura	Médias originais ¹	Médias transformadas
	(erro padrão)	(erro padrão)
MS	1,88 (0,51) b	1,29 (0,15)
WPM	3,63 (0,31) a	1,84 (0,09)

¹ Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna diferem entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância.

No que diz respeito ao número de gemas formadas em plântulas *in vitro*, verificou-se interação significativa para os meios de cultura e concentrações de GA₃ estudadas (Anexo 8A). Os valores médios, observados e estimados, para essa característica, nos meios de cultura MS e WPM, na presença de diferentes concentrações de GA₃ estão representados na Figura 9. Os maiores valores de número de gemas foram obtidos em meio WPM, com oscilações entre as concentrações de GA₃ testadas.

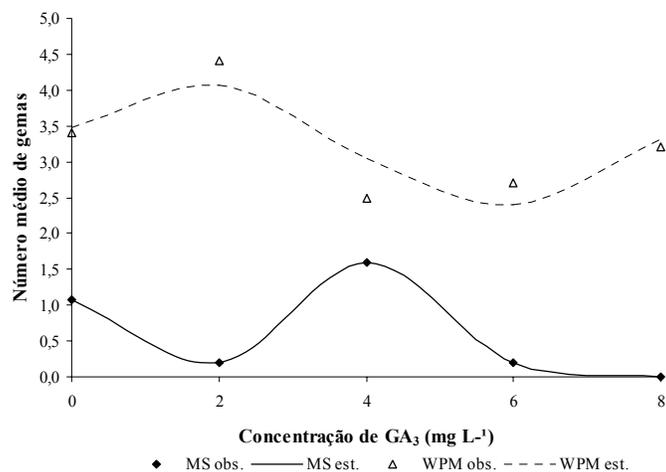


FIGURA 9. Valores observados (obs.) e estimados (est.), pelo modelo log-linear, para o número de gemas formadas em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em função das concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹), para os meios de cultura (MS e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Pelo gráfico da Figura 10, verifica-se que houve interação significativa para a proporção de abscisão foliar entre os meios de cultura (MS e WPM) e as concentrações de GA₃ testadas (Anexo 9A). Observou-se que, até a concentração de 4,0 mg L⁻¹ de GA₃, ocorreu aumento na proporção de abscisão foliar e que, a partir desta concentração, essa proporção foi reduzida significativamente, em meio MS. Entretanto, em meio WPM, a proporção de abscisão foliar elevou-se com o aumento da concentração de GA₃, possivelmente devido às diferenças de composição mineral dos meios de cultura (Anexo 1B e 2B).

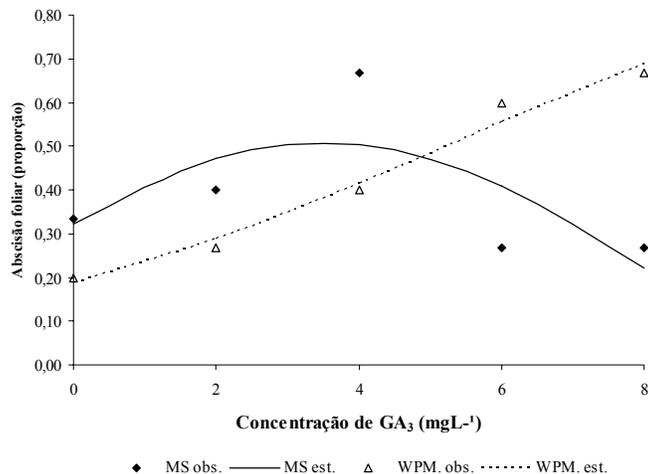


FIGURA 10. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo logístico para a proporção de abscisão foliar em plântulas *in vitro* em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

A espécie em estudo apresenta um mecanismo fisiológico de adaptação, em que ocorre abscisão foliar durante o período de seca, fenômeno conhecido como caducifolia e comum nas plantas da caatinga e cerrado (Nepomuceno et al., 2007). Algumas espécies lenhosas, quando cultivadas *in vitro*, apresentam esse processo em resposta ao ambiente a que são submetidas e, como consequência da abscisão foliar, o crescimento *in vitro* é reduzido e o explante torna-se frágil, impossibilitando a continuação do processo de micropropagação (Lemos & Blake, 1994).

No intuito de reduzir a proporção de abscisão foliar em *A. colubrina*, Nepomuceno et al. (2007) testaram o uso de inibidores de etileno (AgNO₃ e CoCl₂) e observaram pouca eficiência no controle da abscisão foliar. Em outro estudo, Nepomuceno (2006) relata, ainda, que a abscisão dos folíolos iniciou-se

na segunda semana de cultivo, quando foram utilizados tubos selados com filme de PVC. Subseqüente à abscisão dos folíolos, aconteceu a abscisão total das folhas, indicativo da presença de CO₂ e de etileno no interior dos tubos. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o acúmulo deste regulador de crescimento pode interferir na morfogênese das culturas, acelerando a senescência das mesmas.

O aspecto visual de uma plântula *in vitro*, obtida da germinação de eixo embrionário de sementes de *A. colubrina*, pode ser visto na Figura 11.

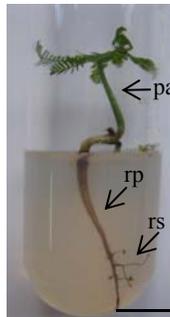


FIGURA 11. Plântula *in vitro* obtida da germinação de eixo embrionário de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, em meio de cultura WPM, suplementado com GA₃ (pa: parte aérea, rp: raiz principal, rs: raízes secundárias). Barra = 1,0 cm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Grattapaglia & Machado (1990) afirmam que, para a maioria das espécies lenhosas, o meio MS completo não tem se mostrado satisfatório em alguns casos e que composições mais diluídas, como as do meio WPM, podem apresentar melhores resultados.

Bertoni et al. (2002) confirmam a eficiência do meio WPM na germinação de sementes de *Zeyheria montana* Mart., uma espécie medicinal do

Cerrado. Os autores reportam que a utilização desse meio menos concentrado promoveu um bom desenvolvimento das plântulas, favorecendo o estabelecimento do protocolo de propagação *in vitro* da espécie.

Reguladores de crescimento não são normalmente requeridos na cultura de embriões, exceto na de embriões muito jovens de algumas espécies, na qual são adicionados para evitar a germinação precoce ou estimular o crescimento embriônico. Dentre os grupos de reguladores conhecidos, destacam-se, para esta função, as giberelinas e as citocininas (Norstog, 1972; Custers, 1982).

Observou-se que plântulas de *A. colubrina* apresentam rápido crescimento *in vitro*, promovido pelo alongamento dos entrenós em função da giberelina endógena, o que promove o crescimento da plântula. Esse fato também foi relatado por Nepomuceno (2006), em estudo com a mesma espécie.

5.2.2 Efeito de BAP e meios de cultura

A porcentagem de germinação de eixos embrionários de sementes de *A. colubrina* nos diferentes meios de cultura (MS e WPM) e diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) testados foi de 100%, não demonstrando efeitos dos tratamentos.

A formação de plântulas obtidas da germinação *in vitro* de eixos embrionários em diferentes concentrações de BAP foi avaliada observando-se as seguintes características: comprimento da raiz principal, número de raízes secundárias, formação de calos na raiz, comprimento da parte aérea, número de brotações, comprimento da maior brotação, número de gemas e abscisão foliar.

Pelos resultados, constata-se efeito significativo dos fatores meios de cultura ($p < 0,0001$) e concentração de BAP ($p < 0,0001$), isoladamente, para a característica comprimento da raiz principal de plântulas *in vitro*. A interação entre meios de cultura e concentrações de BAP não foi significativa ($p = 0,1076$)

(Anexo 10A). Os valores observados para o comprimento da raiz principal, em função dos meios de cultura testados são mostrados na Tabela 3 e, em função das concentrações de BAP, na Figura 12. As plântulas *in vitro* cultivadas em meio MS apresentaram raízes mais longas. Analisando-se as diferentes concentrações de BAP, observou-se redução no comprimento da raiz principal com a elevação da concentração de BAP, em comparação ao tratamento sem fitorregulador, para ambos os meios de cultura testados.

TABELA 3. Valores médios originais e transformados de comprimento da raiz principal (cm) de plântulas *in vitro*, em função dos diferentes meios de cultura estudados (MS e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de cultura	Médias originais ¹ (erro padrão)	Médias transformadas (erro padrão)
MS	4,52 (0,12) a	1,49 (0,03)
WPM	2,58 (0,12) b	1,01 (0,03)

¹ Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na coluna diferem entre si, pelo teste t de Student, a 5% de significância.

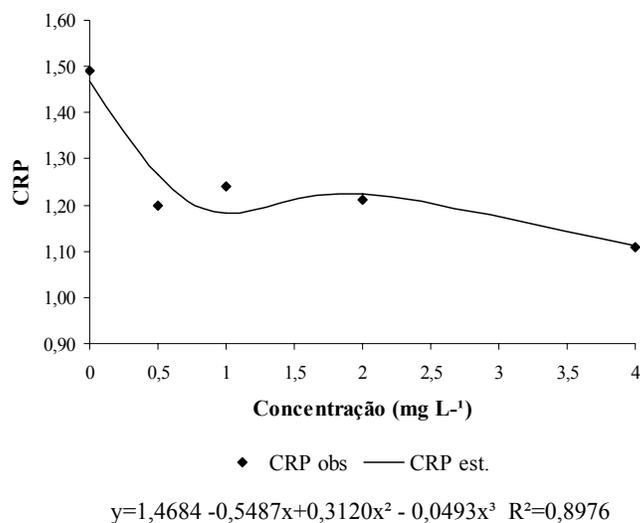


FIGURA 12. Valores médios, observados (obs.) e estimados (est.) do comprimento médio da raiz principal (CRP) (cm), em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em função das concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Quanto ao número de raízes secundárias, não foi possível fazer o ajuste de modelos, uma vez que não houve crescimento de raízes secundárias para as concentrações de BAP estudadas. No meio MS, na ausência de BAP, verificou-se a presença de 10 raízes secundárias. Não foram observadas raízes secundárias para as demais concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultura MS. No meio de cultura WPM, verificou-se a presença de 3 raízes secundárias na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP e, para as demais concentrações de BAP, nesse meio de cultura, não houve formação de raízes secundárias nas plântulas *in vitro* de *A. colubrina*.

Para os diferentes meios de cultura e concentrações de BAP testados houve efeito significativo para a formação de calos nas raízes (Anexo 11A). Os

valores médios observados e estimados, de proporção de formação de calos nas raízes de plântulas *in vitro*, em função das concentrações de BAP, estão representados na Figura 13. Com a elevação da concentração de BAP no meio MS, verificou-se aumento na proporção de formação de calos em raízes de plântulas *in vitro*, enquanto no meio WPM não foi observada elevação na formação de calos nas raízes. Contudo, essa proporção ocorreu em níveis elevados, comparada à do meio MS.

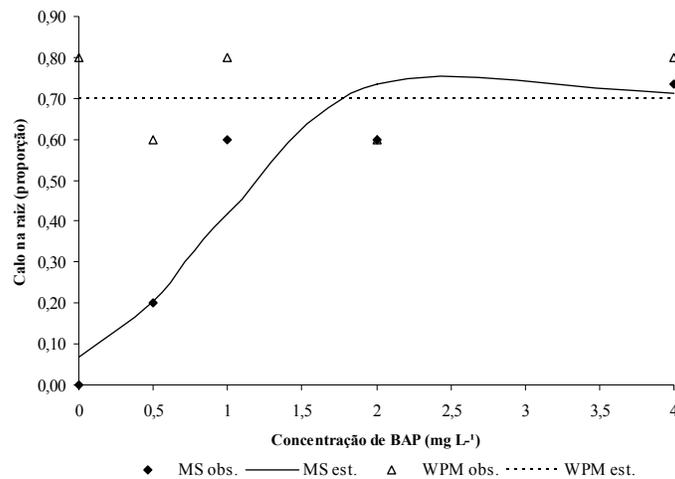


FIGURA 13. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo logístico, de proporção de formação de calos nas raízes de plântulas *in vitro*, em função das concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), para os diferentes meios de cultura (MS e WPM) testados. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os dados contidos no Anexo 12A evidenciam o efeito significativo da interação entre meios de cultura e concentrações de BAP ($p=0,0125$) sobre o

crescimento da parte aérea de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*. Os valores observados e estimados de comprimento médio da parte aérea em cada meio de cultura, em função das concentrações de BAP podem ser observados na Figura 14. Maiores médias de comprimento da parte aérea em plântulas *in vitro* foram obtidas em meio MS, independente da concentração de BAP testado.

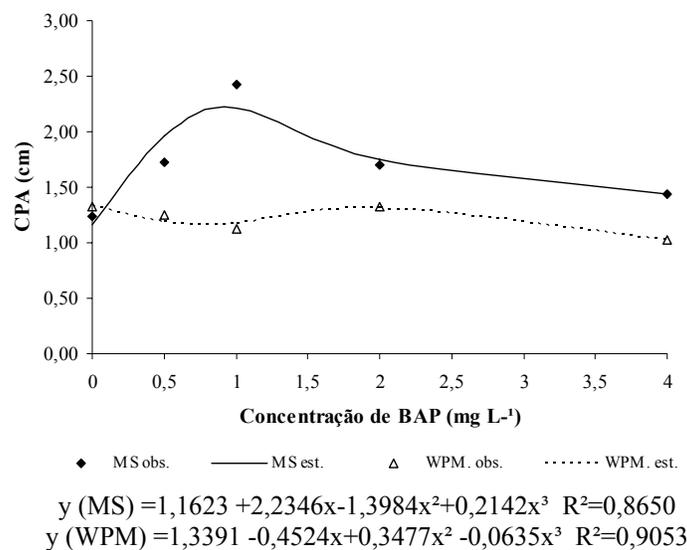


FIGURA 14. Valores médios, observados (obs.) e estimados (est.), do comprimento médio de parte aérea (CPA) (cm) de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em função das concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), para os meios de cultura MS e WPM. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Não foram observados efeitos dos meios de culturas e de BAP sobre o número de brotações em plântulas *in vitro* (Anexo 13A). Os valores médios observados e estimados para o número de brotações, em função das

concentrações de BAP, são representados na Figura 15. Independente do meio utilizado, observou-se elevação do número de brotações até a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, com redução a partir dessa concentração.

Nepomuceno et al. (2007) verificaram a formação de 1,41 brotação por plântula *in vitro* de *A. colubrina*. No entanto, neste estudo, os resultados apontam para um decréscimo de, aproximadamente, 15% nesse valor.

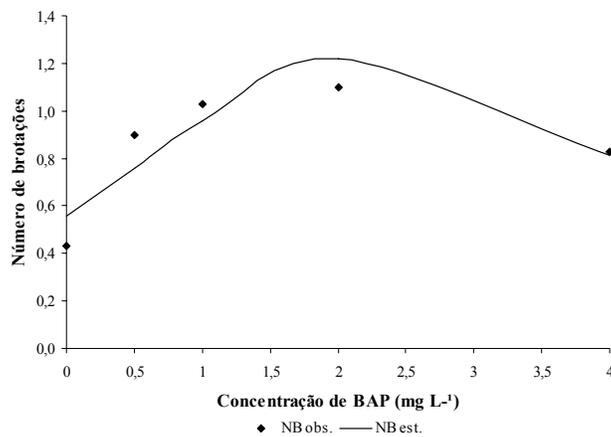


FIGURA 15. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo log-linear para o número de brotações de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em função das concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$). UFLA, Lavras, MG, 2008.

O comprimento da maior brotação em plântulas *in vitro* de *A. colubrina* não foi afetado em ambos os meios de cultura e em diferentes concentrações de BAP (Anexo 14A), com valores variando entre 3,03 cm a 4,03 cm. Os dados referentes a essa característica podem ser visualizados na Tabela 4.

TABELA 4. Valores médios, originais e transformados, de comprimento da maior brotação (cm) em plântulas *in vitro*, em função dos meios de cultura estudados. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de cultura	Médias originais ¹ (erro padrão)	Médias transformadas (erro padrão)
MS	3,03 (0,48)	1,56 (0,12)
WPM	4,03 (0,41)	1,92 (0,10)

Os valores médios observados e estimados para o número de gemas em plântulas *in vitro*, em meios MS e WPM, sob diferentes concentrações de BAP, estão representados na Figura 16 (Anexo 15A).

Os números de gemas por plântula em meio WPM obtidos corroboram os relatados por Nepomuceno et al. (2007), para mesma espécie, os quais verificaram, em média, a formação de 3,3 gemas por plântula.

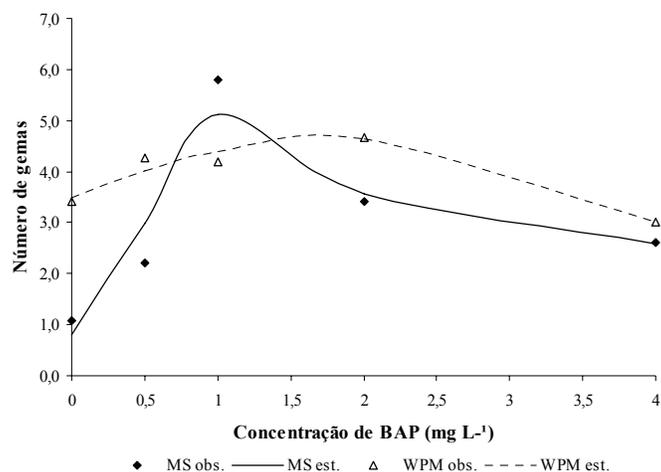


FIGURA 16. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo log-linear, para o número de gemas em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em função das concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), para os meios de cultura (MS e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2008.

No que diz respeito à proporção de abscisão foliar em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, não foram detectados efeitos dos diferentes meios de cultura e concentrações de BAP (Tabela 5 e Anexo 16A).

TABELA 5. Proporção média de abscisão foliar em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em função dos meios de cultura estudados. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de cultura	Proporções
MS	0,36
WPM	0,25

Algumas espécies lenhosas, quando cultivadas *in vitro*, apresentam abscisão foliar precoce em resposta ao ambiente a que são submetidas; como consequência, o crescimento *in vitro* é reduzido e o explante torna-se frágil, impossibilitando a continuação do processo de micropropagação (Lemos & Blake, 1994).

Além da abscisão foliar, as plântulas de *A.colubrina* cultivadas *in vitro* apresentaram entrenós alongados e, conseqüentemente, poucas gemas axilares, o que resulta em baixa produção de explante na fase de multiplicação (Nepomuceno, 2006).

Segundo Erig & Schuch (2005), o acúmulo de etileno tem efeito adverso no desenvolvimento das plantas, afetando a diferenciação, o desenvolvimento, a morfologia e o crescimento das plantas, diminuindo a expansão foliar e o comprimento dos brotos, inibindo a regeneração de novos brotos e causando necrose apical, além de promover abscisão foliar nos cultivos *in vitro*.

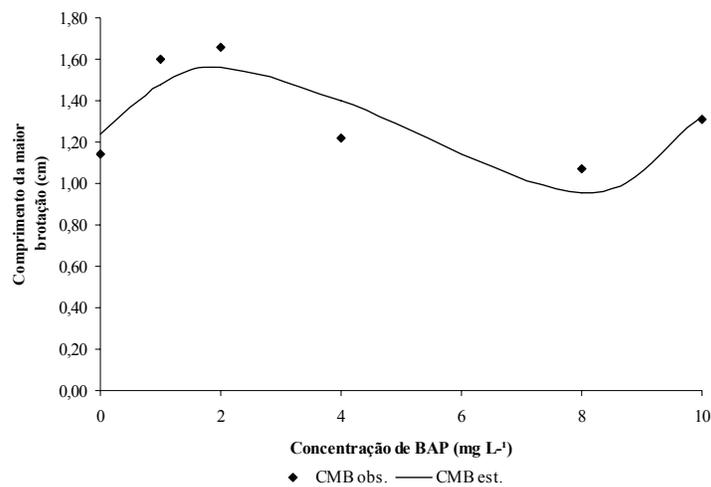
Nepomuceno et al. (2007) observaram a ocorrência de abscisão foliar e relacionaram a hipersensibilidade dos tecidos de *A. colubrina* ao etileno, acarretando limites às etapas seguintes do processo de micropropagação para essa espécie. Na tentativa de atenuar tais efeitos do etileno nessas repostas fisiológicas, esses mesmo autores sugerem o uso de nitrato de prata como o primeiro passo para a etapa de multiplicação no processo de micropropagação dessa espécie.

5.3 Efeito do BAP e ANA na indução de brotações

5.3.1 Comprimento da maior brotação

Pelos resultados, verifica-se que houve efeito significativo das concentrações de BAP sobre o comprimento da maior brotação obtida a partir de

segmento nodal de plântulas *in vitro* de *A. colubrina* (Anexo 17A). No entanto, não houve efeito para as diferentes concentrações de ANA testadas e, tampouco, interação entre as concentrações de BAP e ANA. Considerando-se que a concentração de BAP foi um fator quantitativo, a variável foi estudada por meio de regressão. Os valores observados e estimados de comprimento da maior brotação estão apresentados na Figura 17.



$$Y = 1,2414 + 0,3322x - 0,1004x^2 + 0,0068x^3 \quad R^2 = 0,7334$$

FIGURA 17. Valores médios, observados (obs.) e estimados (est.), do comprimento médio da maior brotação (cm) em segmentos nodais de *A. colubrina* inoculados em meio de cultura MS, em função das concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Pela análise de regressão descrita na Figura 17, observa-se um tipo senoidal para os níveis crescentes de BAP e seus respectivos efeitos sobre o comprimento médio das brotações. Melhor resposta foi verificada em meio suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

O mesmo modelo senoidal também foi observado para o tamanho de brotações em *Rudgea viburnoides*, em meio WPM, suplementado com BAP (Bonilla, et al., 2007).

Grattapaglia & Machado (1998) relatam que há uma tendência de redução do comprimento de brotações a partir de determinada concentração de BAP, devido a um possível efeito fitotóxico da citocinina. Segundo Narayanaswamy (1977), a toxidez causada pelo excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura, ou por exposição prolongada da cultura, pode provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando na redução da taxa de multiplicação e no encurtamento dos caules, dificultando a individualização das plantas para as etapas posteriores de enraizamento.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que *A. colubrina* é uma espécie que necessita de concentrações relativamente baixas de BAP para a obtenção de brotações maiores, sendo prejudicial o uso de concentrações superiores a 2,0 mg L⁻¹ dessa citocinina. Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo para essa característica foram obtidos por Bonilla et al. (2007), para a espécie *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., evidenciando que a presença de BAP foi importante para o processo de micropropagação.

5.3.2 Número de brotações por explante

Não houve efeito da interação entre as concentrações de BAP e ANA, para o número de brotações em segmento nodal de *A. colubrina* (Anexo 18A). Os valores médios observados e estimados do número médio de brotações, em função das concentrações de BAP e ANA, podem ser observados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

Para as diferentes concentrações de BAP testadas, verificou-se uma resposta de modelo log-lineares sobre o número médio de brotações, com valor máximo atingido na concentração de 4,0 mg L⁻¹, seguida de significativa redução a partir dessa concentração (Figura 18). Quanto às concentrações de ANA, observou-se acentuada redução no número de brotações na presença dessa auxina no meio de cultura (Figura 19).

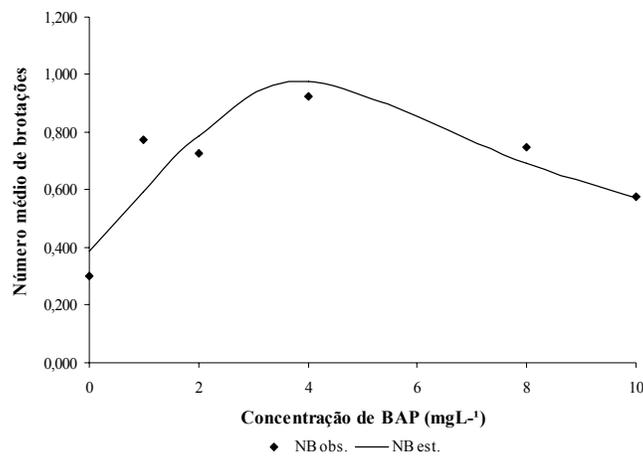


FIGURA 18. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo log-linear para o número médio de brotações por segmento nodal de *A. colubrina*, inoculado em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

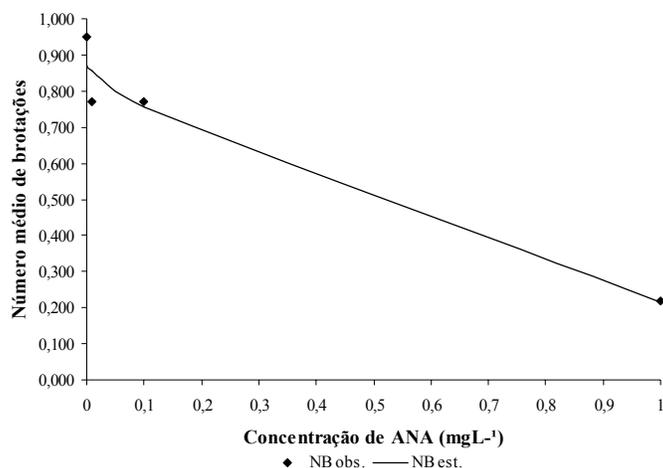


FIGURA 19. Valores observados e estimados pelo modelo log-linear, para o número médio de brotações por segmento nodal de *A. colubrina*, inoculado em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

De acordo com Preece (1995), as citocininas têm função primordial na divisão celular e atuam também na quebra da dominância apical e na indução e no crescimento de brotações. Em adição, o tipo de citocinina e a sua concentração são fatores que definem a resposta das plântulas, bem como o sucesso da multiplicação *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

Soares (2005), estudando a espécie *Hancornia speciosa*, verificou a maior média de brotações, para explantes cultivados na concentração de 5,0 mg L⁻¹ de BAP. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho corroboram os encontrados por Nogueira (2003), que descreve que concentrações acima de 4,0 mg L⁻¹ de BAP não foram eficientes na indução de brotos axilares em segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).

5.3.3 Número de gemas por explante

Os valores médios observados e estimados para número médio de gemas por segmento nodal de *A. colubrina*, em função das concentrações de BAP, são mostrados na Figura 20. Verificou-se efeito significativo para as concentrações de BAP e ANA, tendo, na ausência de auxina no meio de cultura, sido obtido maior número de gemas por segmento nodal de *A. colubrina* (Anexo 19A).

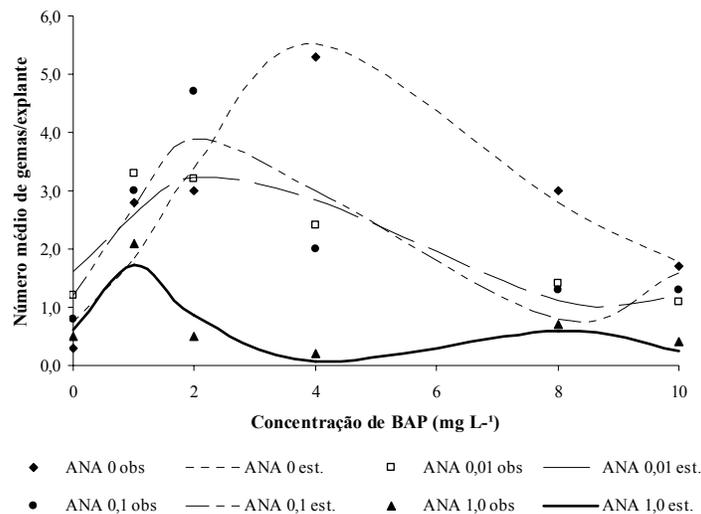


FIGURA 20. Valores médios, observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo log-linear, para contagem média do número de gemas por segmento nodal de *A. colubrina*, em função das concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os valores médios observados e estimados para a contagem média do número de gemas por explante, em função das concentrações de ANA, são

mostrados na Figura 21. Verificaram-se efeitos antagônicos entre concentrações de BAP e ANA. O número médio de gemas por explante reduziu-se com o aumento das concentrações combinadas desses fitorreguladores, com valor próximo a 5 gemas por explante, em concentrações de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA.

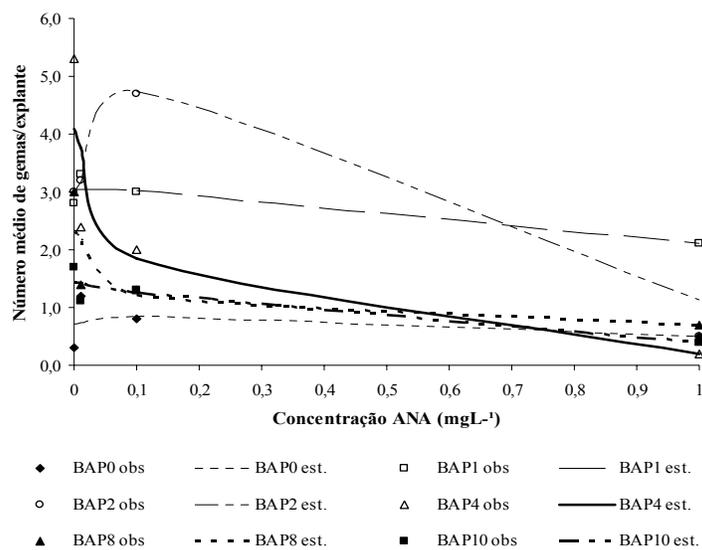


FIGURA 21. Valores médios e estimados pelo modelo log-linear, da contagem média do número de gemas por explante, por segmento nodal de *A. colubrina*, em função das concentrações de ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Das citocininas utilizadas nos meios de multiplicação, a 6-benzilaminopurina (BAP) é considerada a mais eficiente e tem contribuído substancialmente na indução de gemas axilares adventícias durante a multiplicação de explantes, além de se destacar pelo seu menor custo (Grattapaglia & Machado, 1998).

5.3.4 Formação de calos na base dos explantes

Pela análise de Deviance (Anexo 20A), verifica-se que não houve interação significativa para a proporção de formação de calos na base dos segmentos nodais de *A. colubrina*, em função das concentrações de BAP e ANA testadas.

Os valores médios observados e estimados para a proporção de formação de calos na base do explante, em função das concentrações de BAP e ANA, estão representados nas Figuras 22 e 23. Essa proporção elevou-se com o aumento das concentrações de BAP e ANA, isoladamente, no meio de cultura.

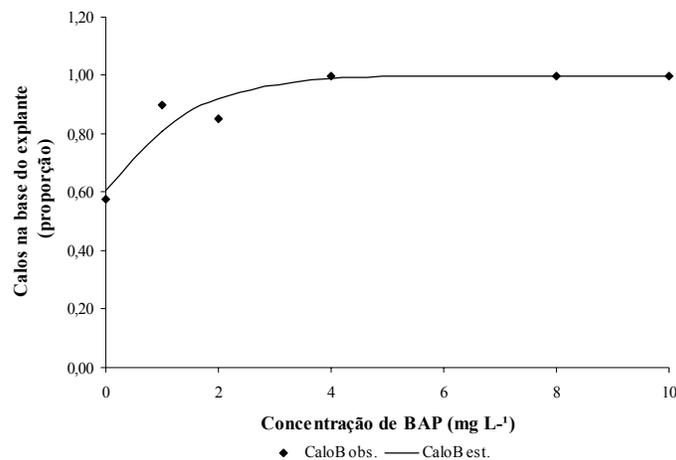


FIGURA 22. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo logístico, para a proporção de formação de calos na base do explante, em função das concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

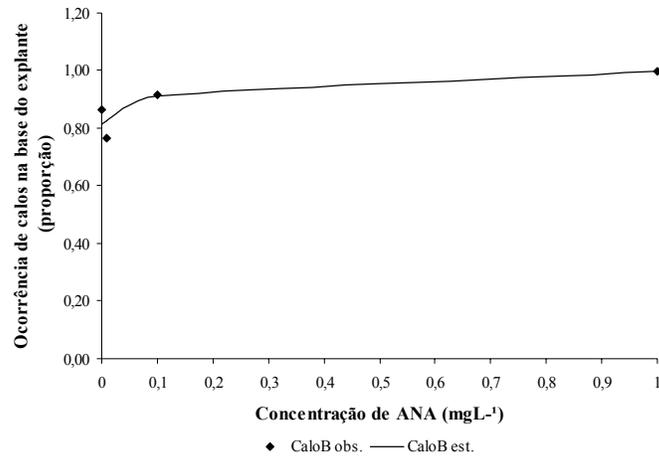


FIGURA 23. Valores observados (obs.) e estimados (est.) pelo modelo logístico, para a proporção de formação de calos na base do explante, em função das concentrações de ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

O aspecto visual dos calos basais formados nos segmentos nodais de *A. colubrina*, na presença de BAP e ANA, pode ser observado na Figura 24.

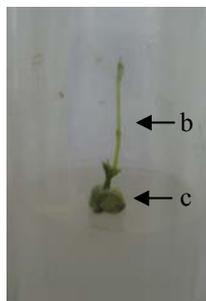


FIGURA 24. Aspecto visual de calos basais formados em brotações de *A. colubrina* cultivadas em meio MS suplementado com 10 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA (b: brotação; c: calo basal). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Em pesquisa com *Inga vera* subsp. *affinis*, Soares (2003) observou que o aumento da concentração de BAP estimulou a formação de calos em segmentos nodais. As concentrações de 6,0, 9,0 e 12,0 mg L⁻¹ deste fitorregulador foram as que apresentaram os resultados mais significativos (70% a 80% de formação de calos). Efeitos equivalentes foram verificados por Bonilla (2002), em *Rudgea viburnoides*. Em estudos *in vitro* com murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), Nogueira (2003) encontrou ocorrência de, aproximadamente, 90% de calos em brotações em meio de cultivo suplementado com 8,0 mg L⁻¹ de BAP. Pelos diversos resultados observados na literatura, verifica-se que a concentração de BAP mais adequada no meio de cultura varia de espécie para espécie.

Segundo Fráguas (2003), a formação de calos, neste caso, não é desejada, já que pode favorecer o surgimento de variações genótípicas no explante.

Apesar de o fitorregulador ANA ser bastante utilizado na multiplicação de explantes, o uso de AIA pode ser mais eficiente. Portanto, nas condições estabelecidas, são necessários novos testes empregando-se esta auxina e outras citocininas, a fim de aumentar o número de brotações, como sugerem Quoirin et al. (2008) para a espécie *Gypsophila paniculata*.

5.4 Efeito do 2,4-D na indução de calos em diferentes explantes

A formação de calos em segmentos caulinares e foliares de *A. colubrina* iniciou-se ao longo da segunda semana de cultivo, a partir de pontos que se expandiam e recobriam a superfície dos explantes.

Na ausência de 2,4-D, a percentagem de calos observada foi inexpressiva, próxima de zero, nos explantes caulinares e foliares (Figuras 25A e 25B).

Em explantes caulinares, nas demais concentrações de 2,4-D, a média da porcentagem de calos verificada em explantes caulinares foi próxima de 100, exceto para 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D no meio, ao reduzir em 50% a formação de calos (Figura 25A).

Em explantes foliares, observou-se valor superior a 80% para a formação de calos, nas concentrações de 5,0, 10,0 e 20,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Em concentrações de 1,0 e 40,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, a formação de calos em explantes foliares variou entre 58% a 62% (Figura 25B), sendo viável economicamente a utilização de baixas concentrações para a indução de calogênese em explantes foliares.

Na Figura 26 verifica-se o aspecto visual dos calos formados em explantes caulinares e foliares. Em explantes caulinares, os calos formados apresentaram coloração amarelada a amarronzada, aspecto rugoso e não friáveis (Figuras 26A e 26B). Os calos formados a partir de explantes foliares apresentaram coloração amarela e marrom, com aparência globular e friável (Figuras 26C e 26D).

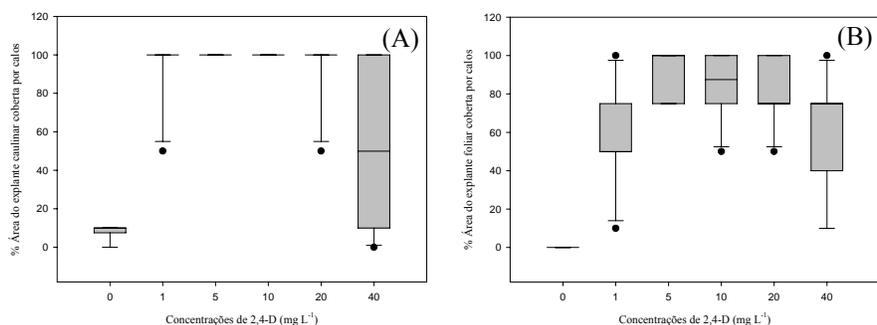


FIGURA 25. Box-plot para porcentagem de área coberta por calos em explantes caulinares (A) e foliares (B) de *A. colubrina*, inoculados em meio WPM, suplementado com 2,4-D, em diferentes concentrações (0,0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

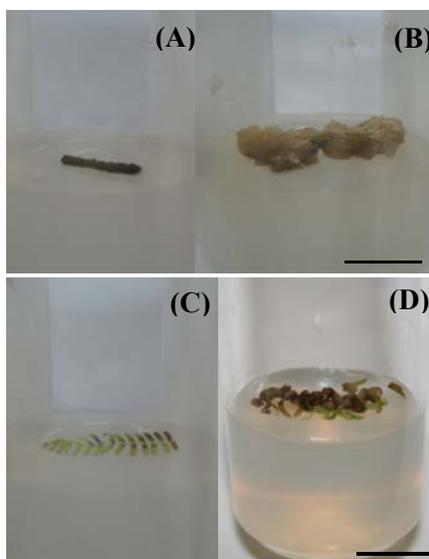


FIGURA 26. Aspecto visual de calos em explantes caulinares e foliares de *A. colubrina* em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D; (A e C) explante caulinar e foliar cultivado na ausência de 2,4-D, (B e D) calos obtidos na presença de 2,4-D. Barra = 1,0 cm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A formação de calos em explantes cotiledonares foi inexpressiva. Esse fato pode ter ocorrido devido à oxidação dos explantes e liberação de metabólitos presentes no material para o meio de cultura, como pode ser visualizado na Figura 27A. A formação de calos somente foi possível em altas concentrações de 2,4-D ($40,0 \text{ mg L}^{-1}$), com média de 32% (Figura 27A). Os calos formados mostraram-se amarelados, com aspecto rugoso e não friável (Figura 28A e 28B).

Em eixos embrionários, a formação de calos foi elevada a partir da concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D,

a formação de calos foi de apenas 24%. Na ausência de 2,4-D, a percentagem de calos observada foi nula, ocorrendo a regeneração dos eixos embrionários (formação de parte aérea e sistema radicular) (Figura 28C). Os calos formados apresentaram coloração amarela e marrom, com aspecto globular e friável (Figura 28D).

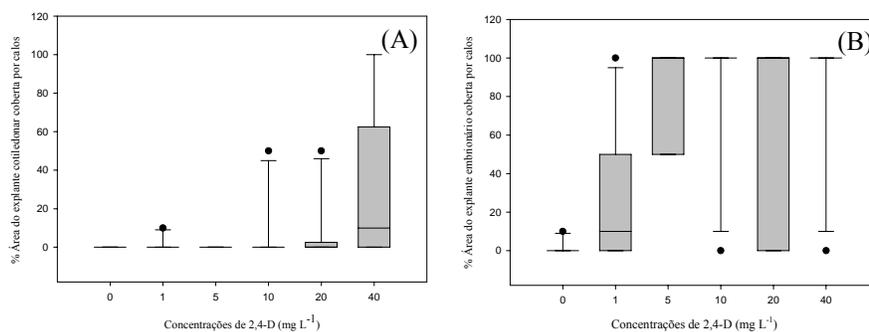


FIGURA 27. Box-plot para percentagem de área coberta por calos em explantes cotiledonares (A) e eixo embrionário (B) de *A. colubrina*, inoculados em meio WPM, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

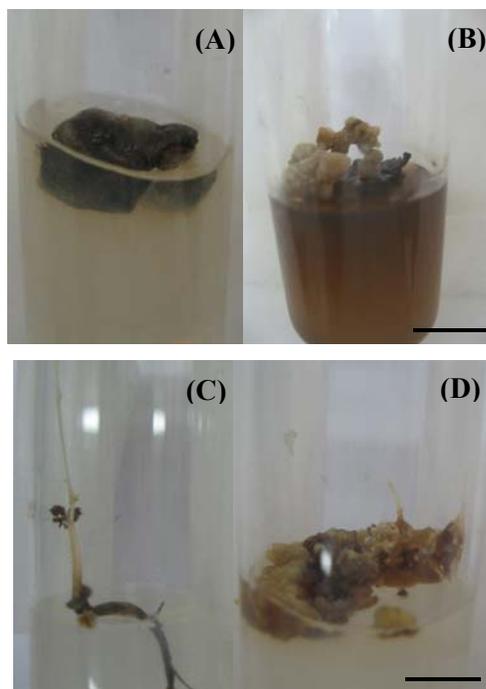


FIGURA 28. Aspecto visual de calos formados em explantes cotiledonares e eixo embrionário de *A. colubrina* em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D; (A e C) explante cotiledonar e eixo embrionário cultivados na ausência de 2,4-D; (B e D) calos obtidos na presença de 2,4-D. Barra = 1,0 cm. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Por meio desses resultados, também se verificou que os eixos embrionários apresentam o melhor nível de resposta ao 2,4-D para a formação de calos. A diferença na resposta ao fitorregulador, provavelmente, está correlacionada a diferenças na quantidade de células responsivas existentes entre os dois tipos de explantes testados (eixos embrionários e cotilédones). Segundo

dados encontrados na literatura, a epiderme de embriões é um dos tecidos mais adequados para a formação de calos. No entanto, segundo Meijer et al. (1999), o desenvolvimento de células e de calos embriogênicos é significativamente influenciado pela composição do meio de cultura.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o 2,4-D tende a estimular a formação de calos, mesmo em baixas concentrações. Este fitorregulador apresenta efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de mRNAs capazes de codificar proteínas requisitadas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada, ou seja, a formação de calos (George, 1996).

Os resultados obtidos nos levam a acreditar que, para iniciar o cultivo *in vitro* de *A. colubrina*, deve-se ater ao tipo de explante, para permitir uma maior porcentagem de calos. Esta afirmativa pode ser corroborada pelo fato de que segmentos caulinares e foliares de plantas *in vitro*, bem como eixos embrionários de sementes maduras, podem ser considerados explantes ideais para a calogênese, devido à alta porcentagem de calos formados, mesmo em baixas concentrações de 2,4-D ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$). No entanto, altas concentrações desse fitorregulador não foram favoráveis à formação de calos embriogênicos neste estudo, durante o período de avaliação adotado.

Segundo Bispo et al. (2007), o comportamento diferencial dos explantes quanto à porcentagem de formação de calos poderia ser explicado por vários fatores, como grau de diferenciação, determinação e competência do tecido, níveis hormonais endógenos e estágio do desenvolvimento do explante.

5.5 Efeito do AIB e caseína hidrolisada no enraizamento *in vitro* de brotações

As concentrações de AIB e de caseína hidrolisada utilizadas nesse experimento não foram suficientes para induzir à rizogênese em brotações de *A. colubrina* cultivadas *in vitro*. Segundo Kulescha (1988), o nível das auxinas endógenas é o que determina a formação de raízes adventícias, ou seja, é o acúmulo de auxinas endógenas que induz à formação de raízes.

Outro fator que possivelmente contribuiu para o não enraizamento das brotações foi o escurecimento dos explantes, indicativo de processos oxidativos, comuns no cultivo *in vitro* de espécies lenhonas (Castro et al., 2000).

No tratamento controle (ausência de AIB e caseína hidrolisada no meio de cultura) também não houve o enraizamento. É possível que o explante apresente concentrações endógenas de citocininas ou residuais dos experimentos de multiplicação, que podem ter levado a um desequilíbrio hormonal, prejudicando a indução e a formação de raízes. A rizogênese é, geralmente, inibida por altas concentrações de citocinina que, utilizada na indução de brotações, pode afetar negativamente o alongamento dos primórdios radiculares (Pasqual, 1998).

Pio et al. (2002) comentaram que a formação de raízes bem desenvolvidas é de grande importância para a sobrevivência e a adaptação das plântulas cultivadas *in vitro*. Assim, como o enraizamento é uma etapa essencial para a continuidade do cultivo de várias espécies, o fato de as brotações de *A. colubrina* não terem sido enraizadas *in vitro* limita a formação de mudas por meio da micropropagação, sendo necessários mais estudos nesta fase do cultivo *in vitro*.

Soares (2005) relata que, para a espécie *Hancornia speciosa* Gomes, não foi possível o enraizamento de brotações em meios acrescidos de diferentes

concentrações de ANA. No entanto, a formação de raízes em brotações de mangabeira foi observada quando, ao meio de cultivo, foram acrescentados 3,0 mg L⁻¹ de AIB.

Nascimento (2008) observou maior número de raízes em segmentos nodais cotiledonares inoculados em meio contendo 1,0 mg L⁻¹ de AIB (2,35 raízes). A maior sobrevivência durante o processo de aclimatização (68%) ocorreu em plantas regeneradas a partir de segmentos nodais cotiledonares em meio contendo 1,0 mg L⁻¹ de AIB. Essa autora relata, ainda, que o segmento nodal cotilenodar é o tipo de explante mais apropriado para a regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan, quando comparado ao segmento nodal.

No que diz respeito ao desenvolvimento vegetativo e radicular de *Oncidium baueri*, nenhum efeito foi observado quando da adição de caseína hidrolisada ao meio de cultura. A suplementação do meio de cultura com caseína hidrolisada, nas mesmas concentrações utilizadas neste trabalho para *A. colubrina*, não foram benéficas para o crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro*, bem como para a sobrevivência *ex vitro* de *Oncidium baueri* (Faria et al. 2007).

Dantas et al. (2002), trabalhando com embriões de macieira *in vitro* no meio MS suplementado com AIA, GA₃ e 500 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, observaram que, entre os tratamentos, o comprimento das brotações não foi afetado. Entretanto, a maior porcentagem de germinação (75%) foi obtida no tratamento com AIA (14 µM), GA₃ (1,5 µM), caseína hidrolisada (500 mg L⁻¹) e cinetina (5 µM). Raganwamy (1961) relatou que a caseína hidrolisada (400 mg L⁻¹) foi essencial para a germinação de embriões de *Citrus microcarpa* X *Triticosecale*, *Oriza sativa* e *Prunus persica*.

O efeito da caseína hidrolizada no meio de cultivo depende em que fase a propagação ocorre. Por exemplo, há efeito sobre a formação *in vitro*, mas pode

não haver efeito sobre o comprimento das brotações, como citado por Dantas (2002) e Raganwamy (1961).

5.6 Aclimatização de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*

Plântulas de *A. colubrina* apresentaram, após 30 dias em sala de crescimento, apenas 9% de sobrevivência, mesmo sendo submetidos a uma pré-aclimatização (Figura 29). Essa baixa taxa de sobrevivência mostra a fragilidade dos tecidos de *A. colubrina*, destacando-se a formação de calos nas raízes das plântulas *in vitro*, o que, possivelmente, dificultou seu estabelecimento *ex vitro*.

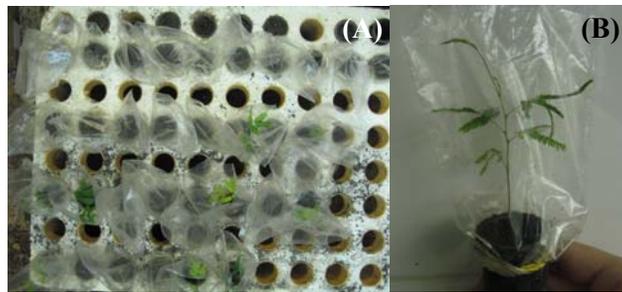


FIGURA 29. Aspecto visual de plântulas de *A. colubrina* em processo de aclimatização (A) e aclimatizadas em tubetes com substrato Plantmax® (B). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Segundo Castro et al. (2007), em plantas desenvolvidas *in vitro*, as raízes adventícias possuem sistema vascular pouco diferenciado e, em plantas lenhosas e semilenhosas, o crescimento secundário não é observado. Como conseqüência, somente uma pequena porcentagem dessas plântulas sobrevivem à aclimatização.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram os relatados por Nascimento (2008), para a espécie *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan, cujo valor de sobrevivência de plântulas, após a transferência para o ambiente *ex vitro*, foi de apenas 7%.

5.7 Anatomia foliar *in vitro*

A presença de estômatos foi verificada na epiderme adaxial e abaxial das lâminas foliares de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, o que caracteriza a espécie como anfiestomática. Não houve diferença estatística para a densidade estomática, diâmetro equatorial e polar dos estômatos em ambas as faces epidérmicas dos folíolos de plântulas *in vitro* (Tabela 30).

TABELA 30. Valores médios das características estomatais em folíolos de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Faces epidérmicas	Número de estômatos/mm ²	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)
Adaxial	26,48 a	58,75 a	98,68 a
Abaxial	29,79 a	58,53 a	92,94 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na Figura 30 podem ser observadas as variações na morfologia dos estômatos dos folíolos de plântulas *in vitro* de *A. colubrina*.

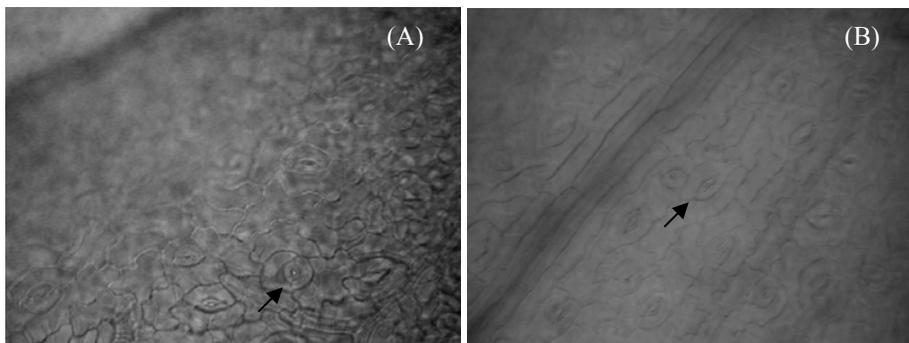


FIGURA 30. Epiderme adaxial e abaxial de folíolos de plântulas *in vitro* em vista paradérmica (A e B). Barra = 30 μm (setas: estômatos). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Castro et al. (2007) relataram diâmetros polar e equatorial bem menores, com valores de 18,57 μm e 15,98 μm , para folíolos de plantas *in vitro* de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae* – *Papilionoideae*)). Esses mesmo autores verificaram a presença de estômatos, distribuídos na face abaxial de folíolos de barbatimão com densidade aproximada de 215,32 estomatos/ mm^2 . Relataram, ainda que, nessa condição de cultivo, as dimensões dos estômatos são variáveis, sendo elípticos, com menor diferença nos diâmetros polar e equatorial, o que é justificado pela fase de diferenciação em que se encontram.

Além dos estômatos, diferenças no formato das células epidérmicas também foram verificadas. As células da epiderme das plântulas mantidas *in vitro* apresentaram-se sinuosas e dotadas de paredes menos espessas, o que pode estar relacionado ao fato de essas plântulas não apresentarem, ainda, características adaptativas contra a perda excessiva de água.

Considerando esses resultados, o conhecimento prévio dos aspectos relacionados à anatomia foliar de *A. colubrina* torna promissor e vantajoso o seu

cultivo *in vitro*, garantindo material vegetal em grande escala e com boas condições assépticas para estudos futuros que venham a explorar suas diversas potencialidades.

O estudo anatômico de órgãos vegetativos de plântulas cultivadas *in vitro* fornece informações importantes para o controle da morfogênese e, no caso das folhas, indica possíveis alterações em tecidos importantes para rotas metabólicas primárias, especialmente a fotossíntese, além de auxiliar na eficiência de protocolos de micropropagação (Ziv, 1995).

6 CONCLUSÕES

O uso de paraformaldeído por 120 minutos é eficiente na desinfestação de eixos embrionários de *A. colubrina*. A utilização de NaOCl (2,0% de cloro ativo) como desinfestante não propicia a formação de plântulas normais.

Todos os meios de cultura testados são eficientes na germinação *in vitro* de eixos embrionários e na formação de plântulas normais de *A. colubrina*, no entanto, obtém-se baixa taxa de sobrevivência *ex vitro*.

A utilização de BAP promove resposta eficiente na indução de brotações em segmentos nodais de *A. colubrina*, sendo prejudicial o uso de concentrações superiores a 2,0 mg L⁻¹ dessa citocinina, por induzir a calogênese na base dos explantes.

O AIB e a caseína hidrolisada nas concentrações testadas não induzem a rizogênese em brotações de *A. colubrina*.

Na ausência de 2,4-D, a calogênese é ausente, comprovando a necessidade da adição do mesmo no meio de cultura. Segmentos caulinares, foliares e embrionários são explantes ideais para a indução de calogênese.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALASRI, A.; ROQUES, C.; MICHEL, G; CABASSUD, C.; APTEL, P. Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination and comparison with chloride and formaldehyde against bacterial water strains. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 7, p. 635-642, July 1992.
- ALASRI, A.; VALVERDE, M.; ROQUES, C.; MICHEL, G; CABASSUD, C.; APTEL, P. Sporicidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination and comparison with chloride and formaldehyde for ultrafiltration membrane desinfection. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, n. 1, p. 52-60, Jan. 1993.
- ALVAREZ-PARDO, V. M; FERREIRA, A. G; NUNES, V. F. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 217-220, abr./jun. 2006.
- BALAKRISHANAN, N. (Ed.). **Handbook of the logit distribution**. New York: CRC, 1992. (Statistics, textbooks and monographs, v. 123).
- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL' ORTO, F. A; OJIMA, M.; IQUE, T. Concentrações 6-Benzilaminopurina (BAP) na taxa de proliferação *in vitro* de macieira Gala. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 5, p. 747-751, maio 1990.
- BERTONI, B. W.; PINA, E. S.; FRANÇA, S. C. de. Micropropagação de *Zeyheria Montana* Mart. – uma planta medicinal do cerrado. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 27., 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD-ROM.
- BISPO, N. B.; GRANDO, M. F. SUZIN, L. A. M. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 890-893, maio/jun. 2007.
- BONILLA, M. G. O. **Propagação *in vivo*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM) Benth.** 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BONILLA, M. G. O.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; COSTA, L. C. do B. Micropropagação de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., uma planta medicinal. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 89-95, 2007.

BORGES, C.; CATTELAN, L. V.; VARGAS, D. P.; BOBROWSKI, V. L. Avaliação citotóxica de formol e hipoclorito de sódio utilizados na desinfestação de sementes em cultura de tecidos de plantas. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., 2005, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UFPel, 2005.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística Básica**. São Paulo: Atual, 1987.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CASTRO, A. H. F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E. M. de; VITOR, S. M. M.; FERNANDES, A. M. Cultivo *in vitro* e aspectos da anatomia foliar de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Fabaceae – Papilionoideae]. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 61-68, 2007.

CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp.)**. 2000. 191 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Will. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 2, p. 1-7, dez. 1999.

DE LUCCA, P. C. **Produção dos hormônios recombinantes de crescimento e pró-insulina humanos em plantas transgênicas de milho**. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, Campinas.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.4, p. 961-965, jul./ago. 2005.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

FIOR, C. S.; PRESTES, C. G.; RODRIGUES, L. R. Desinfestação com paraformaldeído com cultivo *in vitro* de *Limonium platyphyllum* Lincz. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 24-30, 2005.

- FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; KÄMPF, A. N. Assepsia com paraformaldeído no cultivo de discos foliares e segmentos nodais de *Limonium platyphyllum* Lincz. In: ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: FAO, 2001. p. 01-89. 1 CD-ROM.
- GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A., VASIL, I. K. Plant tissue culture media. **In vitro**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 4738, July 1976.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 2 in practice**. 2. ed. Edingdon: Exegetics, 1996.
- GOMES, M. L. de O. **Germinação in vitro de Parkinsonia aculeata L.: uma espécie de uso múltiplo ocorrente nas matas ciliares da caatinga**. 2007. 47 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-169.
- GRAZIANO, K. U.; CIANCIARULLO, T. L.; GONTIJO-FILHO, P. P. Avaliação da atividade esterilizante do paraformaldeído. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 42, n. 1/4, p. 79-89, 1989.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 371-393.
- JAIN, S. M., ISHII, K. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In: MANTELL, S.; BRUNS, C.; TRAGARDH, A. M.; Viana, S. H. (Ed.). **Recent advances in biotechnology for conservation and management**. Stockholm: International Foundation for Science, 1998. p. 214-231.
- KIKUCHI, T. Y. P.; NUNES, H. da C. B.; MOTA, M. G. da C.; VIEIRA, I. M. dos S.; RIBEIRO, S. I.; CORRÊA, M. L. P. Assepsia para sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc vaugh) cultivadas *in vitro* In:

ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: FAO, 2001. p. 01-59. 1 CD-ROM.

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

KULESCHA, Z. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.63-71, 1988.

LEDO, A. S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JUNIOR, J. F. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e agrotécologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, jul./ago. 2007.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Leaf abscission in micropropagated sugar apple (*Annona squamosa* L.). In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 232-237.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980.

MEIJER, E. A.; DE VRIES, S. C.; MORDHORST, A. P. Co-culture with *Daucus carota* somatic embryos reveals high 2,4-D uptake and release rates of *Arabidopsis thaliana* cultured cells. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 7/8, p. 656-663, Mar. 1999.

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

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 179-248.

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e Germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* *Benth* (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 141-143, jul. 2007. Supl.

NASCIMENTO, P. K. V. **Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan**. 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

NEPOMUCENO, C. F. **Crescimento *in vitro* e controle morfofisiológico em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul.** 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. de O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 5, p. 967-975, set./out. 2007.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M.; NERY, F. C.; Silva, D. G. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (VAHL) NICH. **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2008.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).** 2003. 88 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 597-603, Fortaleza, 2003.

OLIVEIRA, V. P.; BENBADIS, A. K.; CARVALHO, A. C. P. P. Avaliação da regeneração *in vitro* de explantes de caupi e soja. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 2, p. 153-159, 2006.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura.** Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PASQUAL, M.; HOFFMAN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 159 p.

PEREIRA, R. de C. A.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; BERTOLLUCI, S. K. V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J.F.Gmel. (unha de gato). **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 69-77, 2007.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Controle hormonal do desenvolvimento de raízes. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 181-196, mar. 2000.

PIO, R. **Ácido indolbutírico e sacarose no enraizamento de estacas apicais e desenvolvimento inicial da figueira (*Ficus carica* L.)**. 2002. 109p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Bangladesh, n. 1, v. 1, p. 26-37, 1995.

QUOIRIN, M. G. G.; BIASI, L. A.; RIOS, J. F.; CUQUEL, F. L. Micropropagação de *Gypsophila* pela cultura de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2008.

RODRIGUES, J. D.; ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; FERREIRA, E. A.; ROCHA, H. S.; RODRIGUES, F. A. Ácido giberélico e número de explantes na propagação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 78-82, 2007.

SANTOS, B. R. et al. Controle da contaminação de explantes foliares e caulinares de pequiheiro (*Cariocar brasiliense* CAMB), visando o estabelecimento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 635, ago. 2005. Suplemento.

SOARES, F. P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 121 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SONDAHL, M. R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W. R. Propagation of coffee. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. P.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**, New York: Plenum, 1985. p. 215-232.

VIEIRA, J. G. Z.; YAMAKAMI, J. K.; AGUIAR, R. S.; UNEMOTO, L. K.; FARIA, R.T. Influência da caseína hidrolisada no cultivo *in vitro* de *Oncidium baueri* (*Orchidaceae*). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 207-212, abr./jun. 2007

CAPÍTULO IV

TOLERÂNCIA AO CONGELAMENTO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

1 RESUMO

NERY, Fernanda Carlota. Tolerância ao congelamento de eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. In: _____. **Germinação, cultivo *in vitro* e tolerância ao congelamento de sementes de angico-vermelho** (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan). 2008. Cap. 4, p. 159-198. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A preservação *ex situ* e a utilização racional de *A. colubrina* demandam informações conclusivas, entre outros aspectos, quanto ao armazenamento das sementes por períodos prolongados. Essa prática é de importância, principalmente para espécies que apresentam dificuldades de propagação e que estejam ameaçadas de extinção. A criopreservação, isto é, o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), oferece potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é paralisada. Considerando a importância de se empregar eixos embrionários como elemento de conservação dos recursos genéticos de *A. colubrina*, foi realizado este trabalho com o objetivo de se desenvolver um protocolo para a criopreservação de eixos embrionários de sementes dessa espécie. Foram avaliados a germinação e o vigor de sementes armazenadas em câmara fria (8°C e 45% UR), por 12 meses e em temperaturas inferiores a zero (-20°C, -80°C, -196°C), por 15, 30 e 150 dias de armazenamento. Os eixos embrionários obtidos de sementes de *A. colubrina* recém-colhidas foram armazenados em criotubos de 2,0 mL (10 eixos por criotubo) e submetidos ao armazenamento nas mesmas temperaturas inferiores a zero e tempos descritos anteriormente. Foram utilizados também crioprotetores químicos na crioconservação de eixos embrionários, sendo testados dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, em três concentrações (5%, 10% e 15%). O comportamento das sementes de *A. colubrina* é ortodoxo quanto à tolerância ao congelamento. A conservação de eixos embrionários dessa espécie *A. colubrina* em temperaturas inferiores a zero não requer uso de crioprotetores químicos e propicia elevada percentagem de regeneração no cultivo *in vitro*.

* Comitê Orientador: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (orientador), Renato Paiva, PhD – UFLA, José Márcio Rocha Faria, PhD – UFLA, Dr^a Cristina Filomena Justo – UFMT (co-orientadores).

2 ABSTRACT

NERY, Fernanda Carlota. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan embryonic axes freezing tolerance. In: _____. **Germination, *in vitro* cultivation and freezing tolerance of red angico seeds (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)**. 2008. Chap. 4, p. 159-198. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The *ex situ* preservation and rational use of *A. colubrina* demand conclusive information, among other things, about the seeds storage for long periods. This practice is important, mainly for species which presents propagation difficulties and are endangered of extinction. The cryopreservation, that is, the storage in liquid nitrogen (-196°C), offers a potential for preservation without limits of time, reducing the metabolism to levels so low that all the biochemical processes are significantly reduced and the biological deterioration is paralyzed. Considering the importance of using embryonic axes as conservation elements of the genetic resources of *A. colubrina*, this work was done in order to develop a cryopreservation protocol of embryonic axes of seeds of this species. It was evaluated the germination and vigor of seeds stored in cold chamber (8°C and 45% RM) for 12 months, and in temperatures below zero (-20°C, -80°C, -196°C) for 15, 30 and 150 days of storage. The embryonic axes from *A. colubrina* seeds newly harvested, were stored in cryotubes of 2.0 mL (10 axes in each cryotube) and subjected to the same storage temperatures below zero and periods, described above. It was also used chemical cryoprotectors in the conservation of embryonic axes, being tested dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol, in three concentrations (5%, 10% and 15%). The behavior of *A. colubrina* seeds is orthodox for the freezing tolerance. The conservation of embryonic axes of the species *A. colubrina* in temperatures below zero, did not require the use of chemical cryoprotectors and promotes a high percentage of regeneration at the *in vitro* culture.

* Adviser Comitee: Dr. Amauri Alves de Alvarenga – UFLA (Adviser), Renato Paiva, PhD – UFLA, José Márcio Rocha Faria, PhD – UFLA, Dr^a Cristina Filomena Justo – UFMT (Co-advisers).

3 INTRODUÇÃO

O angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) (*Fabaceae* – *Mimosoideae*) é uma espécie de ampla ocorrência, facilmente adaptada a diversos tipos de ambiente, em vários países da América do Sul. Possui elevado potencial econômico, sendo bastante utilizada com fins ornamentais, medicinais e para o fornecimento de tanino, resina, madeira e mel. Devido a esse uso intenso, aliado aos problemas de degradação ambiental, é considerada como estando sob risco de extinção (Rodrigues, 2005). Segundo Lorenzi (1992), a espécie pode ser aproveitada para a arborização de parques, praças e para o plantio em florestas mistas destinadas à recuperação de áreas degradadas.

A exploração desordenada, a falta de práticas adequadas de manejo ou de uma política de reflorestamento que vise à reposição das árvores exploradas e, sobretudo, a falta de outras opções de matéria-prima (espécies produtoras de taninos) capazes de, em curto prazo, substituírem ou constituírem, com o angico, misturas para o curtimento de couros e peles, estão colocando em risco a extinção dessa espécie (Diniz et al., 2003; Paes et al., 2006).

A preservação *ex situ* e a utilização racional do angico-vermelho demandam informações conclusivas, entre outros aspectos, quanto ao armazenamento das sementes por períodos prolongados. Essa prática é de importância, principalmente para espécies que apresentam dificuldades de propagação e que, como o angico-vermelho, estejam ameaçadas de extinção. De maneira geral, a capacidade de armazenamento das sementes está associada à sua qualidade inicial e às condições de armazenamento (Roberts, 1973, Carvalho & Nakagawa, 2000).

Uma das mais importantes e difíceis tarefas no processo de conservação é superar a deterioração fisiológica da semente. Sistemas de refrigeração

mecânica, que mantêm a semente desidratada sob temperatura de -20°C , aumentam seu período de armazenamento (International Board for Plant Genetic Resources, 1976). Entretanto, a essa temperatura, o metabolismo da semente não é completamente interrompido e, com o aumento do período de armazenamento, a deterioração ainda pode ocorrer, resultando na perda de precioso material genético (Stanwood, 1985).

A criopreservação, ou seja, o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), oferece potencial para a preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é paralisada (Kantha, 1985). Essa técnica tem sido proposta para a conservação a longo prazo de germoplasma (Stanwood & Bass, 1981). O aumento na longevidade da semente reduziria a frequência das atividades de multiplicação de plantas, diminuindo o risco de contaminação e de modificações na composição genética do acesso original (Stanwood & Roos, 1979).

Resultados obtidos após congelamento em nitrogênio líquido de sementes de espécies florestais nativas de clima tropical e subtropical indicam que sementes de *Albizia lebbek* (L.) Benth. (*Fabaceae* – *Mimosoideae*) e de *Anadenanthera macrocarpa* Benth., entre outras, podem ser criopreservadas com sucesso (Wetzel et al., 2003).

Atualmente, a criopreservação de eixos embrionários vem se destacando como a metodologia mais apropriada para a conservação a longo prazo da diversidade genética das espécies vegetais. Isso porque os eixos toleram condições que seriam letais para a semente inteira (Berjak et al., 2000; Santos et al., 2002), além de ocupar o mínimo de espaço (Stushnoff & Seufferhled, 1995; Youngjie et al., 1997; Lopes et al., 2004) e reduzir a possível presença de microrganismos no armazenamento, os quais prejudicam a qualidade fisiológica das sementes. Além disso, a criopreservação reduz a ação dos radicais livres,

que estão entre os agentes causadores de envelhecimento celular (Brandão Júnior et al., 2002; Rajasekaran et al., 2005). No entanto, estudos recentes podem colocar em cheque vários pressupostos sobre as causas da deterioração e da morte das sementes (Chappel Junior, 2008).

González-Benito et al. (1998) resgataram, *in vitro*, eixos embrionários de algodoeiro criopreservados com teor de água abaixo de 20%, sem perda da viabilidade. Santos et al. (2002) avaliaram a criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.), constatando que eixos que apresentaram 12,6% de umidade permaneceram viáveis após criopreservação. Faiad et al. (2004) informaram que eixos embrionários podem tolerar teores de umidade por volta de 12% e subsequente congelamento em nitrogênio líquido e resgatados, após criopreservação, utilizando-se a cultura de tecidos. Deles se originam plantas inteiras. As técnicas de conservação *in vitro* podem, indiscutivelmente, constituir metodologias valiosas para a conservação de recursos genéticos. Entretanto, existe o potencial risco de instabilidade genética nas culturas submetidas a essas técnicas (Harding et al., 1997; Withers & Williams, 1998).

Procedimentos criogênicos simplificados, como vitrificação (Sakai et al., 1990) e encapsulamento-dessecação (Fabre & Dereuddre, 1990), que eliminam a necessidade de congeladores programáveis de custo elevado, garantindo fácil obtenção do material após congelamento com elevadas taxas de recuperação, são preferidos na criopreservação de germoplasma vegetal (Engelmann, 1997). A vitrificação é alcançada pela redução da água congelável intra e extracelular, por meio da exposição dos tecidos das plantas a misturas crioprotetoras muito concentradas ou pela dessecação física e subsequente congelamento rápido, geralmente pela imersão direta no nitrogênio líquido.

Segundo Vieira (2000), dentre os protetores químicos utilizados na solução de vitrificação, destacam-se dimetilsulfóxido (DMSO), metanol,

glicerol, etileno glicol e propileno glicol, dentre outros. No entanto, segundo Kartha (1985) e Sakai (1995), o emprego de crioprotetores químicos pode causar citotoxicidade e estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfo genética em cultura.

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (Dolezel, 1997). As partículas em suspensão movem-se imersas num fluido (tampão de extração) no interior de um capilar dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo (Dolezel, 1997). Essas partículas atravessam, uma a uma, um feixe de laser, ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (Dolezel & Bartos, 2005). A intensidade de dispersão da luz ou da emissão de fluorescência está relacionada com as propriedades das partículas que estão sendo analisadas (Dolezel & Bartos, 2005).

Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (Dolezel & Bartos, 2005). Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucos gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear (Galbraith et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas, entre elas, estimação do tamanho do genoma, avaliação de ploidia, detecção de mixoploidia e aneuploidias, avaliação de ciclo celular, estudo de eliminação cromossômica, separação de células, cromossomos ou organelas (Dolezel & Bartos, 2005).

Segundo Wittiman (2001), a citometria de fluxo para a determinação da quantidade de DNA é um avanço e uma contribuição importantíssima para

estudos de melhoramento genético, especialmente no manejo de grandes coleções de germoplasma.

Considerando a importância de se empregar eixos embrionários como elemento de conservação dos recursos genéticos de *Anadenanthera colubrina*, foi realizado este trabalho, com o objetivo de se desenvolver um protocolo para a criopreservação de eixos embrionários de sementes dessa espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foram coletadas na época de dispersão, agosto e setembro de 2007, em, aproximadamente, 50 árvores matrizes localizadas no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no Sul do estado de Minas Gerais, nas coordenadas geográficas 21°13'17'' S e 44°57'47'' W. O clima da região é do tipo Cwb de Köppen (mesotérmico com verões brandos e estiagens de inverno), a precipitação e a temperatura média anual são, respectivamente, de 1.493,2 mm e de 19,3°C, com 66% da precipitação, ocorrendo no período de novembro a fevereiro (Vilela & Ramalho, 1979).

Posteriormente à coleta, as sementes foram encaminhadas ao Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, no Setor de Fisiologia Vegetal no Departamento de Biologia (UFLA), onde foram beneficiadas manualmente e, em seguida, submetidas às condições de armazenamento, como descrito nos itens 4.2 e 4.3.

4.2 Armazenamento das sementes em câmara fria e em temperaturas inferiores a zero

As sementes, após o beneficiamento, foram armazenadas em câmara fria (8°C e 45% de umidade relativa) em embalagens de polietileno, no Laboratório de Sementes Florestais, no Departamento de Ciências Florestais da UFLA. Antes do armazenamento, foi determinado o grau de umidade das sementes em estufa, a 105±3°C, por 24 horas (Brasil, 1992).

As sementes armazenadas em câmara fria foram avaliadas quanto à percentagem de germinação e ao índice de velocidade de germinação. Foi realizado também um monitoriamento do grau de umidade, por um período de 12 meses, submetidas a avaliações em seis períodos (0, 4, 6, 8, 10 e 12 meses).

O grau de umidade foi determinado com base em massa úmida, utilizando-se estufa a 105±3°C, por 24 horas (Brasil, 1992). Os testes de germinação foram realizados em câmaras de germinação do tipo Mangelsdorf®, em temperatura constante de 30°C, na presença de luz e umidade relativa de, aproximadamente, 100%, sendo utilizado como substrato rolo de papel Germtest® umedecido com água destilada (2,5 vezes o peso do papel) (Brasil, 1992). As avaliações foram realizadas diariamente a partir da protusão da radícula a ±2,0 mm.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi conduzido juntamente com o teste de germinação, sendo as avaliações realizadas diariamente, a partir da protusão radicular. Para o cálculo do IVG, foi empregada a equação proposta por Maguire (1962).

Foi instalado um segundo experimento de armazenamento das sementes intactas em imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C), ultrafreezer (-80°C) e freezer (-20°C), permanecendo nessas condições por 15, 30 e 150 dias. Após o quê, foram descongeladas em banho-maria, a 37°C, por, aproximadamente, 5

minutos, e avaliadas quanto à porcentagem de germinação (protrusão radicular a $\pm 2,0$ mm) e ao vigor. Os testes de germinação e de vigor (IVG) foram realizados como descritos anteriormente.

Os ensaios foram conduzidos seguindo-se o delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 25 sementes para cada tratamento. Os dados de germinação foram transformados em $\arcsen (X/100)^{0,5}$ e os dados do índice de velocidade de germinação foram transformados em $(X + 0,5)^{0,5}$ (Bonzatto & Kronka, 1989).

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística do software estatístico Sisvar (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, sendo os dados referentes ao tempo de armazenamento estudados pela análise de regressão polinomial.

4.3 Armazenamento de eixos embrionários em temperaturas inferiores a zero

Os eixos embrionários obtidos de sementes de *A. colubrina* recém-colhidas foram armazenados em criotubos de 2,0 mL (10 eixos por criotubo) e submetidos ao armazenamento em temperaturas inferiores a zero. Os tratamentos constituíram de imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C), ultrafreezer (-80°C) e freezer (-20°C), permanecendo nessas condições por 15, 30 e 150 dias.

O grau de umidade dos eixos embrionários foi determinado antes e após cada período de armazenamento, utilizando-se estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$, até peso constante (Brasil, 1992), empregando-se três repetições de 10 eixos, e o valor expresso em porcentagem, com base na massa úmida.

Após o período de crioconservação, os eixos embrionários foram retirados e submetidos ao descongelamento em banho-maria, a 37°C, por 5 minutos. Posteriormente, os eixos foram desinfestados por 120 minutos, em placas de Petri lacradas, contendo duas drágeas de paraformaldeído 80% e inoculados, em câmara de fluxo laminar, em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi solidificado com 4,0 g L⁻¹ de ágar e o pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C e pressão de 1,0 atm, durante 20 minutos. Foram utilizadas 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um eixo embrionário.

Após a inoculação, os eixos embrionários foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻²s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. A avaliação foi realizada após 30 dias de incubação, sendo contabilizada a porcentagem de eixos embrionários germinados, tendo como critério de germinação a formação de plântulas normais, avaliando-se o comprimento da parte aérea e o sistema radicular, com auxílio de régua graduada.

Foram testados também crioprotetores químicos na crioconservação de eixos embrionários, sendo testados dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, ambos em três concentrações diferentes (5%, 10% e 15%). Após os períodos de armazenamento, 15, 30 e 150 dias, os eixos tiveram essas substâncias crioprotetoras removidas, sendo lavados três vezes com água destilada e, em seguida, foram inoculados no meio de cultura descrito anteriormente e submetidos às condições para possível regeneração em plântulas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística do software estatístico Sisvar (Ferreira, 2000). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, sendo os dados

referentes ao tempo de armazenamento analisados pela análise de regressão polinomial.

4.4 Quantificação e integridade do DNA nuclear

A quantificação de DNA nuclear foi realizada em eixos embrionários armazenados em nitrogênio líquido (-196°C). Foram avaliados eixos embrionários armazenados sem o uso de substâncias crioprotetoras (testemunha) e criopreservados com a utilização de crioprotetores químicos, DMSO e glicerol, ambos nas concentrações de 5%, 10% e 15%. A avaliação foi feita em eixos embrionários armazenados por 30 dias, nessas condições. Como controle, avaliou-se a quantidade e a integridade do DNA nuclear em eixos embrionários armazenados em câmara fria por 6 meses.

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram conduzidos no Laboratório de Genética e Imunologia, na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Para cada tratamento, três amostras foram avaliadas, com o objetivo de estimar a quantidade de DNA nuclear. De 20 mg a 30 mg de eixo embrionário, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Pisum sativum* (2C = 9,09 pg) (padrão interno de referência), foram triturados em placa de Petri contendo 1,0 mL de tampão LB01 gelado para lise celular e liberação dos núcleos em suspensão (Dolezel et al., 1997). A suspensão foi aspirada por meio de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear posteriormente filtrada em uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados adicionando-se, 25 µL de iodeto de propídio e 5,0 µL de RNase. As amostras foram armazenadas no escuro e analisadas até 1 hora após preparo. Para cada amostra, foram analisados, pelo menos, 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson) e o conteúdo de DNA nuclear (pg) do eixo embrionário foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*). A análise estatística foi realizada por meio do software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA em (pg) para os tratamentos foi estimado como mostrado a seguir:

$$\frac{\text{Amostra (eixos embrionários)}}{\text{DNA 2C (pg)}} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{Canal do pico G1 do padrão}} \times \text{Conteúdo de DNA padrão}$$

Foi realizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) para a comparação das médias entre os tratamentos, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

4.5 Avaliação ultraestrutural de eixos embrionários

O preparo das amostras e as observações em microscópio eletrônico de transmissão foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia, na UFPA.

Os tratamentos submetidos à visualização constituíram de eixos embrionários antes de serem armazenados (testemunha) e, após criopreservação a -196°C , -80°C e -20°C . Avaliaram-se também eixos embrionários criopreservados a -196°C com uso de crioprotetores químicos, DMSO 15% e glicerol 15%. A visualização foi feita em eixos embrionários submetidos por 30 dias nessas condições.

Os eixos embrionários foram fixados em Karnovsky modificado: glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato 0,05 M,

pH 7,2 e CaCl_2 0,001 M (Karnovsky, 1965), sendo mantidos em geladeira, a 10°C , até posterior processamento.

Posteriormente, esses fragmentos foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 4 horas. Em seguida, iniciou-se a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, por 10 minutos e três vezes por 10 minutos, em 100%). Logo depois, o material foi incluído em gradiente crescente de acetona e resina Spurr 30%, por 8 horas, a 70% por 12 horas e 2 vezes a 100%, em intervalos de 24 horas. Os tecidos eram emblocados em resina pura e colocados em estufa, a 70°C , por 48 horas para a polimerização. Os blocos obtidos foram desbastados com lâminas de aço para a retirada da resina excedente.

Foram realizados os cortes em seções semifinas ($1,0\ \mu\text{m}$) e ultrafinas ($<100\ \text{nm}$), utilizando-se um ultramicrotomo Reichert-Jung, com navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados em lâminas de vidro, coloridos com azul de toluidina (1,0 g azul de toluidina, 1,0 g borato de sódio e 100 mL de água purificados por meio de filtro Millipore $0,2\ \mu\text{m}$) e montados permanentemente em meio Permalt. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro (*golden slot grids*) e secos em raques de alumínio cobertos com formvar (Rowley & Moran, 1975). As seções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 minutos cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 902 a 80Kv (Alves, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Armazenamento das sementes em câmara fria

O grau de umidade das sementes aumentou de 9% para 11%, quando armazenados em câmara fria, ao final de 12 meses. Mas, considerando que, nesse intervalo, a semente possui teor de água do tipo 2, pequenas variações podem contribuir significativamente para a deterioração das sementes, uma vez que, para a porcentagem de germinação, houve efeito significativo ao longo do período de armazenamento das sementes em câmara fria, com redução de 100% para 66% de germinação, ao final de 12 meses (Figura 1). O mesmo foi observado quanto ao índice de velocidade de germinação, com redução do vigor das sementes ao longo do período de armazenamento (Figura 2).

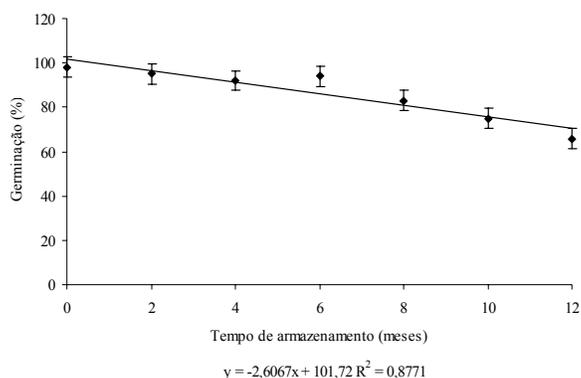


FIGURA 1. Germinação (%) de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, armazenadas em câmara fria (8°C e 45% UR), em embalagens de polietileno, por 12 meses. UFLA, Lavras, MG, 2008.

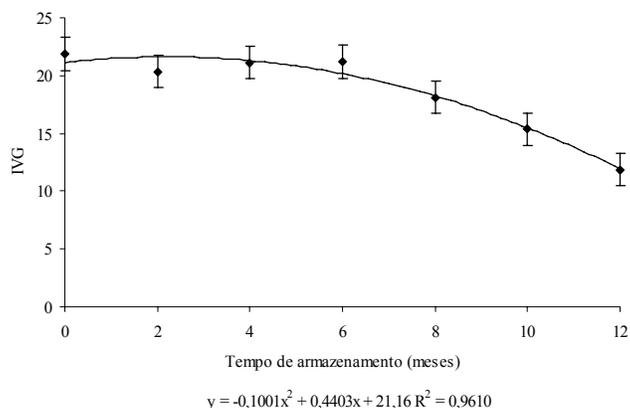


FIGURA 2. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, armazenadas em câmara fria (8°C e 45% UR), em embalagens de polietileno, por 12 meses. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, ressalta-se que a espécie estudada apresenta comportamento descrito por Kageyama & Viana (1991) para as espécies secundárias ou oportunistas, com boas perspectivas de armazenamento em condições controladas.

O baixo teor de lipídeos das sementes de *A. colubrina* (capítulo II) pode ter propiciado a menor deterioração das sementes. Segundo Harrington (1972), a auto-oxidação de lipídios produz radicais livres, mesmo em sementes com baixo teor de água, que podem combinar com proteínas e nucleotídeos, destruindo enzimas, lipoproteínas, DNA e a capacidade reprodutiva das células. Em sementes com baixo teor de água, uma parte da água monomolecular é retirada das macromoléculas, removendo a camada que protege as sementes contra o processo oxidativo. Contendo baixo teor de lipídio, é provável que as sementes de *A. colubrina* mantenham sua qualidade fisiológica por um período

mais prolongado que o estudado neste trabalho. Esse fato também foi verificado por Marques (2007) para sementes de angico de duas outras espécies. No entanto, o teor elevado de proteínas pode contribuir para a redução do potencial de armazenamento, devido à elevada afinidade dessa substância com a água (Marcos Filho, 2005).

5.2 Armazenamento das sementes em temperaturas inferiores a zero

O grau de umidade das sementes de *A. colubrina* não diferiu, ao longo do período de armazenamento, nas diferentes temperaturas testadas, sendo, em média, de 11%.

Para a porcentagem de germinação de sementes intactas armazenadas em temperaturas inferiores a zero, houve diferença significativa entre as temperaturas testadas e o tempo de armazenamento, com maiores valores no armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), seguido do armazenamento em ultrafreezer (-80°C) e freezer (-20°C). Em todos os tratamentos, a porcentagem de germinação reduziu ao longo do período (Figura 3). O mesmo comportamento foi verificado quanto ao índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes armazenadas nas diferentes temperaturas inferiores a zero, ocorrendo redução significativa no vigor dessas, ao longo do período, para todos os tratamentos testados. Vigor superior foi obtido para sementes armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C), seguido do armazenamento em ultrafreezer (-80°C) e freezer (-20°C) (Figura 4).

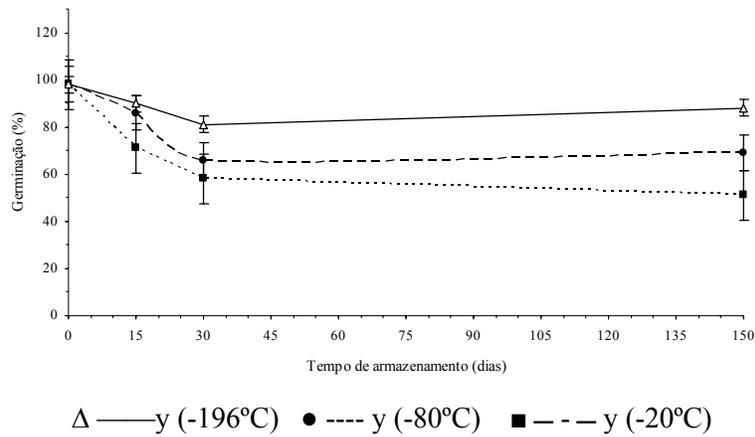


FIGURA 3. Germinação (%) de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, em função da temperatura (-196°C, -80°C e -20°C) e do período de armazenamento (0, 15, 30 e 150 dias). UFLA, Lavras, MG, 2008.

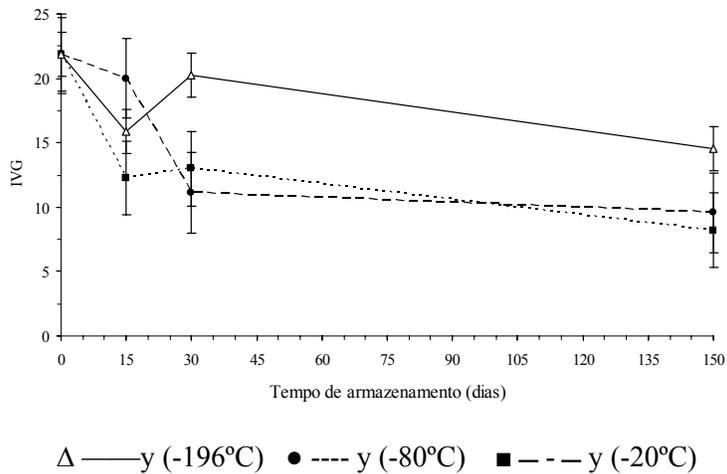


FIGURA 4. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, em função da temperatura (-196°C, -80°C e -20°C) e do período de armazenamento (0, 15, 30 e 150 dias). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Com base nos dados das Figuras 3 e 4, pôde-se confirmar a importância da redução da temperatura de armazenamento para a manutenção da viabilidade das sementes de *A. colubrina*, conforme já mostrado por Marques (2007). O mesmo foi relatado, para sementes de pau-brasil, por Hellman et al. (2006), quando compararam o armazenamento dessas sementes a -18°C , 7°C e 25°C .

O armazenamento de sementes ortodoxas a -18°C é adotado pela maioria dos bancos de sementes, o que permite prolongar a longevidade das sementes por muitas décadas (Santos, 2000). Contudo, freqüentemente, esta temperatura está associada a baixos teores de água nas sementes, entre 3% a 7% (Theilade & Petri, 2003) diferente, portanto, das sementes de *A. colubrina* estudadas neste trabalho, que estavam com 11% de teor de água.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os relatados por Salomão (2002), para sementes da mesma espécie, *A. colubrina*, com 7,1% de grau de umidade. A germinabilidade das sementes não diferiu antes e depois da imersão em nitrogênio líquido (-196°C) por 3 dias, com valores acima de 93%. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram também com os obtidos por Wetzell et al. (2003) para sementes de *Cassia ferruginea* (Schrader.) Schrader Ex DC., *Sclerolobium aureum* (Tul.) Benth. e *Platypodium elegans* Vog., tendo ocorrido decréscimo de germinação após a imersão no nitrogênio líquido. No entanto, esses mesmos autores observaram que, para sementes de *Anadenanthera macrocarpa* Benth., *Bauhinia* sp., *Hymenaea stignocarpa* Mart. Ex Hayne e *Mimosa setosa* Benth., todas da família *Fabaceae*, ligeiro aumento na germinação ocorreu após imersão em nitrogênio líquido (-196°C), por 7 dias.

Segundo Reis & Cunha (1997), o congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) aumenta a absorção de água, a velocidade de germinação e o poder germinativo das sementes; esse ambiente mostra-se como alternativa para a conservação, a longo prazo, das sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.). Esses autores concluíram, ainda, que as sementes dessa

espécie apresentam comportamento ortodoxo, pela tolerância a baixos conteúdos de umidade e ao congelamento nas temperaturas abaixo de zero grau.

Venzke et al. (2006) relataram redução na porcentagem de germinação de sementes de *Parapiptadenia rígida*, quando foram crioconservadas, a -196°C , por uma hora. No entanto, esses autores atribuem essa redução ao elevado grau de umidade das sementes, quando submetidas à temperatura criogênica. Esses autores relataram, ainda, que a umidade é fator limitante para a manutenção da qualidade fisiológica e para a integridade metabólica das sementes. Coelho & Mata (2008) descreveram que, para sementes de algodão, o teor de umidade crítico para o crioarmazenamento é de 6% a 8%, sem perda da sua viabilidade.

Diniz et al. (1999) observaram que sementes de milho perdem um percentual significativo de germinabilidade e vigor até 30 dias crioconservadas e, após este período, tendem manter sua qualidade fisiológica.

Para Almeida (2006), o grau de umidade das sementes, sua composição química e as velocidades de congelamento e descongelamento são os fatores que, habitualmente, consideram-se como determinantes do efeito da crioconservação sobre as sementes, assim como as sementes de menor tamanho, uma composição química rica em lipídios ou velocidade de congelamento ou descongelamento inadequadas podem afetar a viabilidade das sementes.

5.3 Armazenamento de eixos embrionários em temperaturas inferiores a zero

O grau de umidade do eixo embrionário não diferiu ao longo do período de armazenamento nas diferentes temperaturas testadas, sendo em média de 11,7%.

Eixos embrionários armazenados sob temperaturas de -196°C , -80°C e -20°C , imersos em crioprotetores químicos, DMSO ou glicerol, em concentrações

de 5%, 10% e 15%, possivelmente, embeberam as soluções crioprotetoras e o grau de umidade observado foi acima de 65%, para todos os tratamentos testados (Tabela 1).

TABELA 1. Grau de umidade (%) de eixos embrionários *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan submetidos a temperaturas de -196°C, -80°C e -20°C, imersos em crioprotetores químicos, DMSO ou glicerol, a 5%, 10% e 15%, por 15, 30 e 150 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tratamentos	Temperaturas								
	-196°C	-80°C	-20°C	-196°C	-80°C	-20°C	-196°C	-80°C	-20°C
	15 dias			30 dias			150 dias		
Sem crioprotetor	11,0	8,52	17,2	13,4	18,5	13,6	14,9	12,9	18,6
DMSO 5%	73,1	74,9	70,9	71,2	71,2	74,8	75,0	78,9	73,5
DMSO 10%	73,6	75,4	71,3	70,5	70,5	76,2	74,5	72,8	73,4
DMSO 15%	70,1	76,1	69,2	71,1	71,1	68,9	77,5	72,6	70,9
Glicerol 5%	73,9	71,1	71,4	70,4	70,4	84,7	78,7	73,5	76,6
Glicerol 10%	72,2	70,2	74,3	72,8	87,1	76,0	76,2	72,9	69,9
Glicerol 15%	70,7	68,9	72,9	85,1	73,3	71,5	66,1	76,4	72,4

O teor de água das sementes é, provavelmente, o fator mais crítico para o sucesso da crioconservação. Se a umidade da semente é muito alta, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e de descongelamento (Venzke et al., 2006). Existe um nível máximo de umidade (NMU) para o congelamento (*High Moisture Freezing Limit*) acima do qual a viabilidade da semente é reduzida (Stanwood, 1985). Este limite crítico é, em

geral, uma faixa relativamente estreita de umidade para cada espécie, mas pode variar entre espécies.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os relatados por Molina et al. (2006), para sementes de cebola crioconservadas sem crioprotetor o teor de água das sementes foi mantido após o descongelamento, não diferindo da testemunha. No entanto, a crioconservação com crioprotetor aumentou em 42 pontos percentuais do teor de água das sementes após o descongelamento, evidenciando que o crioprotetor utilizado, glicerol a 50%, aumentou acentuadamente o teor de água das sementes.

Quimicamente, o glicerol é um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxila que podem aceitar um hidrogênio da molécula de água em seis sítios diferentes (Gonzalez, 2004) e pode ser utilizado para reduzir o dano físico e favorecer o processo de vitrificação durante a etapa de congelamento a temperaturas ultrabaixas. Entretanto, é importante observar o comportamento das sementes de diferentes espécies em presença deste crioprotetor e em diferentes concentrações (Molina et al., 2006).

Hellman et al. (2006) também relataram que, para sementes de pau-brasil armazenadas a -18°C , com teor de água elevado, houve expressiva redução da capacidade germinativa, com apenas 10% de germinação e 8% produzindo plântulas normais, após 30 dias de armazenamento, culminando com a perda total da germinação aos 90 dias de armazenamento. Santos (2002) descreveu que, nesses casos, pode ocorrer a formação de cristais de gelo a partir da água livre presente no interior das células, acarretando injúrias e causando a perda da capacidade germinativa.

A regeneração dos eixos embrionários crioconservados sem uso de crioprotetores químicos manteve a viabilidade em torno dos 100%, independente do período de crioarmazenamento. No entanto, quando foram utilizados crioprotetores químicos, a porcentagem de germinação foi nula, o que pode ser

explicado pelo elevado grau de umidade dos eixos embrionários após descongelamento, reduzindo a viabilidade desses.

Quanto aos eixos embrionários regenerados, verificou-se, para o comprimento da parte aérea de plântulas *in vitro*, que não houve diferença significativa entre a interação dos fatores temperaturas e períodos de armazenamento. Não houve efeito significativo para o fator temperatura de armazenamento, isoladamente. No entanto, verifica-se que quanto maior o período de armazenamento dos eixos embrionários, maior é comprimento médio da parte aérea (Figura 5). O mesmo comportamento foi verificado para o comprimento do sistema radicular (Figura 5).

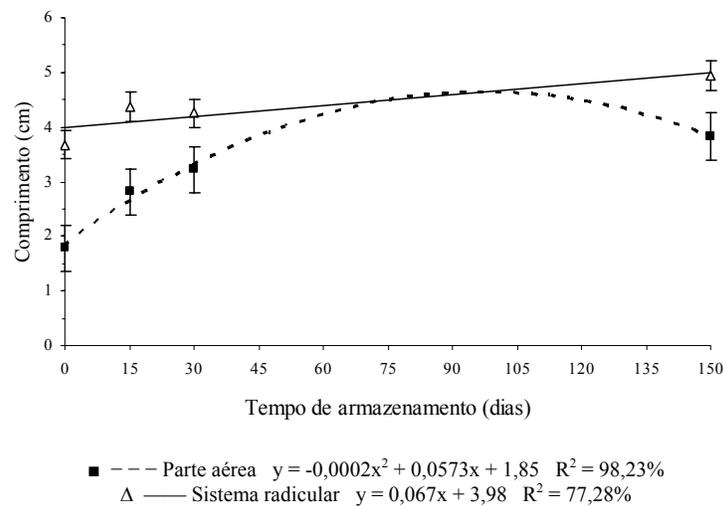


FIGURA 5. Comprimento (cm) de parte aérea e sistema radicular de plântulas *in vitro* de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, em função de diferentes temperaturas (-196°C, -80°C, -20°C) e períodos de armazenamento (0, 15, 30 e 150 dias). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Lopes et al. (2004) sugeriram a criopreservação de eixos embrionários de mamona como alternativa viável para a conservação de germoplasma dessa cultura. No entanto, para sementes de nim (*Azadirachata indica*), a criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) reduziu o valor de 96% de germinação, no primeiro mês, para 45%, ao final de 12 meses de armazenamento (Varghese & Naithani, 2008).

Segundo Molina et al. (2006), sementes de cebola criopreservadas com o uso de crioprotetor (glicerol 50% v/v) apresentaram um decréscimo acentuado na germinação. No entanto, em sementes de orégano criopreservadas, sob ação do glicerol como crioprotetor, foram constatados valores de germinação superiores aos daquelas submetidas ao nitrogênio líquido sem glicerol, indicando a necessidade do uso de glicerol como crioprotetor para a conservação dessas sementes (Vargas et al., 2004).

O mesmo foi relatado por Santos (2004) e Cho et al. (2002) que verificaram que eixos embrionários de *Citrus* encapsulados com alginato de sódio e não desidratados não sobreviveram à exposição ao nitrogênio líquido, sendo possível a regeneração desses com a desidratação em sílica gel das cápsulas contendo os eixos embrionários.

O estresse de congelamento, com o uso de crioprotetor, pode ter causado a interrupção e a desestruturação de alguns processos metabólicos, assim como reportado por Fleck et al. (1999) e Dumet & Benson (2000) com outros sistemas biológicos. Alguns crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênética em cultura (Sakai, 1995). Também é possível que os danos observados na criopreservação possam ter sido causados pela perda da integridade celular, devido à formação de cristais de gelo e ao emprego do crioprotetor, que pode danificar membranas, conforme descrito no trabalho realizado por Martínez-Montero et al. (2002). Entretanto, segundo Winkelmann

et al. (2004), o pré-tratamento com 0,6 M de sacarose e 10% DMSO, por 1 hora, influenciou positivamente a regeneração de calos criopreservados de *Cyclamen persicum* Mill. No entanto, Lopes (2005) relatou que concentrações acima de 5% de DMSO afetaram a viabilidade dos explantes caulinares e cotiledonares de algodoeiro e mamoneira.

Um parâmetro importante que deve ser observado para cada procedimento de criopreservação é o período pelo qual o material pode ser conservado, de tal forma que, quando avaliado, mostre pelo menos 60% de sobrevivência (Vieira, 2000). Pelos resultados apresentados nesta pesquisa, observa-se que a criopreservação, sem uso de crioprotetor, manteve a viabilidade das sementes de *A. colubrina*, por 150 dias. Estes resultados são promissores e demonstram que sementes de angico podem ser criopreservadas, com relativa eficiência, se, conforme Diniz (1999), forem estudados alguns parâmetros, como teor de água mais adequado, técnicas de congelamento e métodos de descongelamento. Segundo Taiz & Zeiger (2004), células vegetativas totalmente hidratadas podem também reter viabilidade, se elas foram esfriadas muito rapidamente, para evitar a formação de cristais de gelo grandes e de crescimento lento, que poderiam perfurar e destruir estruturas subcelulares. Os cristais de gelo que se formam durante congelamento muito rápido são demasiadamente pequenos para provocar dano. Inversamente, é necessário o rápido aquecimento de tecido congelado para evitar a transformação de pequenos cristais de gelo em cristais de tamanhos que possam causar dano ou para evitar a perda de vapor de água por sublimação, pois ambos ocorrem sob temperaturas intermediárias (-100° a -10°C) (Taiz & Zeiger, 2004).

Sror et al. (2003) relataram a existência de proteínas chamadas crioprotectinas WAX9, que são capazes de estabilizar membranas de tilacóides congeladas a -20°C. Essas proteínas explicariam a tolerância ao congelamento de sementes sem o uso de crioprotetores. Hinch et al. (1993) descreveram, ainda,

que há semelhanças na estrutura de crioprotectinas e LEA proteínas, sendo estas responsáveis pela tolerância à dessecação em sementes.

5.4 Quantificação e integridade do DNA nuclear

Pela análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear em células em interfase de eixos embrionários, verificou-se que houve diferença estatística entre eixos embrionários armazenados em câmara fria e em nitrogênio líquido (-196°C) (Tabela 2). Pelos resultados, verifica-se que os percentuais de *sub-G1* são relativamente altos, o que evidencia, de certo modo, que o material não foi perfeitamente criopreservado, pois esta fração é um indicativo de fragmentos de núcleos ou núcleos com tamanho inferior ao do padrão utilizado. No entanto, detectou-se a existência de núcleos intactos em todos os tratamentos, representada pelos valores em percentuais G1.

Eixos embrionários mantidos em câmara fria apresentaram valor de *sub-G1* igual a 87%, ou seja, apenas 13% dos núcleos permaneceram intactos em câmara fria (controle). Nota-se que o crioarmazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) favoreceu a integridade do DNA nuclear dos eixos embrionários, sem a necessidade de uso de crioprotetores. Entretanto, quando foram utilizados crioprotetores químicos, foram verificados menores percentuais de núcleos intactos em eixos embrionários (Tabela 2).

TABELA 2. Análise de quantidade de núcleos intactos (% G1) e fragmentos (% sub-G1) e germinação (%) de eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, armazenados em câmara fria por 6 meses e a -196°C, por 30 dias, em diferentes concentrações de crioprotetores (DMSO e glicerol). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tratamentos	% G1	% sub-G1	Germinação (%)
Controle (câmara fria)	13±2,56 c	87±3,87 a	86
Sem crioprotetor	45±5,67 b	55±4,78 b	100
5% glicerol	56±4,34 a	44±4,56 c	0
10% glicerol	56±5,67 a	44±6,34 c	0
15 % glicerol	61±6,31 a	39±7,89 c	0
5% DMSO	54±5,48 a	46±6,78 c	0
10% DMSO	53±5,71 a	47±5,67 c	0
15% DMSO	56±4,58 a	44±6,78 c	0

Médias seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Scott & Knott, $p \leq 0,05$).

Pela Figura 6, podem-se visualizar os percentuais de núcleos intactos (G1), em função dos diferentes crioprotetores e concentrações testadas. Concentrações mais elevadas de crioprotetor poderiam ser benéficas para a manutenção da integridade nuclear em eixos embrionários de *A. colubrina*. Entre os crioprotetores testados, nas mesmas concentrações, houve maior percentual de núcleos em G1 para o glicerol, comparado ao DMSO.

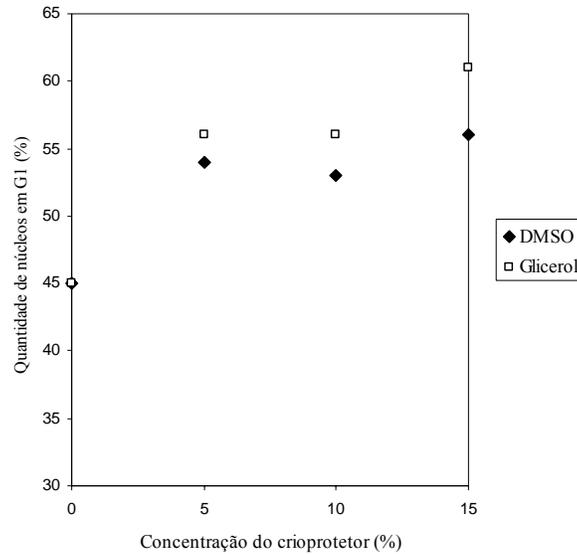


FIGURA 6. Quantidade de núcleos, em G1(%), em eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan criopreservados a -196°C por 30 dias, em função de diferentes concentrações (0%, 5%, 10% e 15%) de crioprotetores (DMSO e glicerol). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Esta maior frequência de células interfásicas é esperada, pelo fato de a interfase ser a fase mais longa do ciclo celular na maioria das células de organismos eucariotos. O ciclo celular das células somáticas está dividido em duas fases: a interfase e a divisão celular ou mitose. A interfase é constituída pelas fases G1 (crescimento celular), S (duplicação dos cromossomos) e G2 (preparo para a divisão celular) (Molina et al., 2006). Como os eixos embrionários na semente não embebida estão fisiologicamente inativos, espera-se que não sejam observados núcleos na fase S e G2.

Lezcano et al. (2004) também verificaram, pelo uso de citometria de fluxo, a toxicidade dos crioprotetores, DMSO e glicerol, sobre células espermáticas de peixes. Esses agentes, em concentrações de 5% a 30%, reduziram significativamente a viabilidade celular.

5.5 Avaliação ultraestrutural de eixos embrionários criopreservados

Quando se comparam, ultra-estruturalmente, as células de eixos embrionários antes do armazenamento (Figura 7A), constata-se que nenhum dano aparente foi visualizado em eixos embrionários, após a criopreservação em diferentes temperaturas inferiores a zero (Figura 7B, 7C e 7D), sendo possível distinguir a presença de corpúsculos aproximadamente do mesmo tamanho da Figura 7a. No entanto, o padrão de distribuição desses corpúsculos alterou-se, ocorrendo de modo mais aleatório nas células. Talvez o congelamento tenha afetado o citoesqueleto, causando distúrbio na distribuição dos componentes celulares.

Embora não fossem evidentes sinais visuais de necrose em eixos embrionários de *A. colubrina*, a não regeneração desses, quando se utilizaram crioprotetores químicos no armazenamento em temperaturas inferiores a zero, pôde ser confirmada pelas análises ultra-estruturais (Figuras 7E e 7F). As alterações celulares durante a criopreservação dos eixos embrionários acontecem pela desorganização do conteúdo celular e vários danos às células, como dobras na parede celular e fragmentação do citoplasma.

O mesmo foi relatado por Faria et al. (2006), ao estudarem o armazenamento, a 5°C, de embriões de *Inga vera* subsp. *affinis*.

Wesleysmith et al. (1995) verificaram, em eixos embrionários de *Pisum sativum* L. embebidos em água destilada por 24 horas, que a integridade do tonoplasto e a estrutura interna da matriz mitocondrial foram mantidas após

descongelamento, embora anormalidades na plasmalema tenham sido observadas em 77% das células examinadas, não tendo sido constatada a regeneração desses eixos embrionários hidratados. Esse fato pode ser explicado, segundo esses mesmo autores, pelo fato de que, após 24 horas de embebição, os eixos embrionários tornaram-se sensíveis à dessecação, coincidindo com a redução no conteúdo de oligossacarídeos, que agem como crioprotetores endógenos das células contra o congelamento.

Apesar de o glicerol ser o crioprotetor mais utilizado no congelamento de diferentes materiais biológicos, seus efeitos deletérios sobre os espermatozoides ocorrem, provavelmente, pelas alterações causadas na membrana plasmática (Soares et al., 2002).

Kyrychenko & Dyubko (2008) sugerem que o efeito citotóxico dos crioprotetores, como o DMSO e o glicerol, em contato por longos períodos com a membrana celular, podem resultar em danos irreversíveis na membrana, em função da perda da integridade da estrutura da bicamada lipídica.

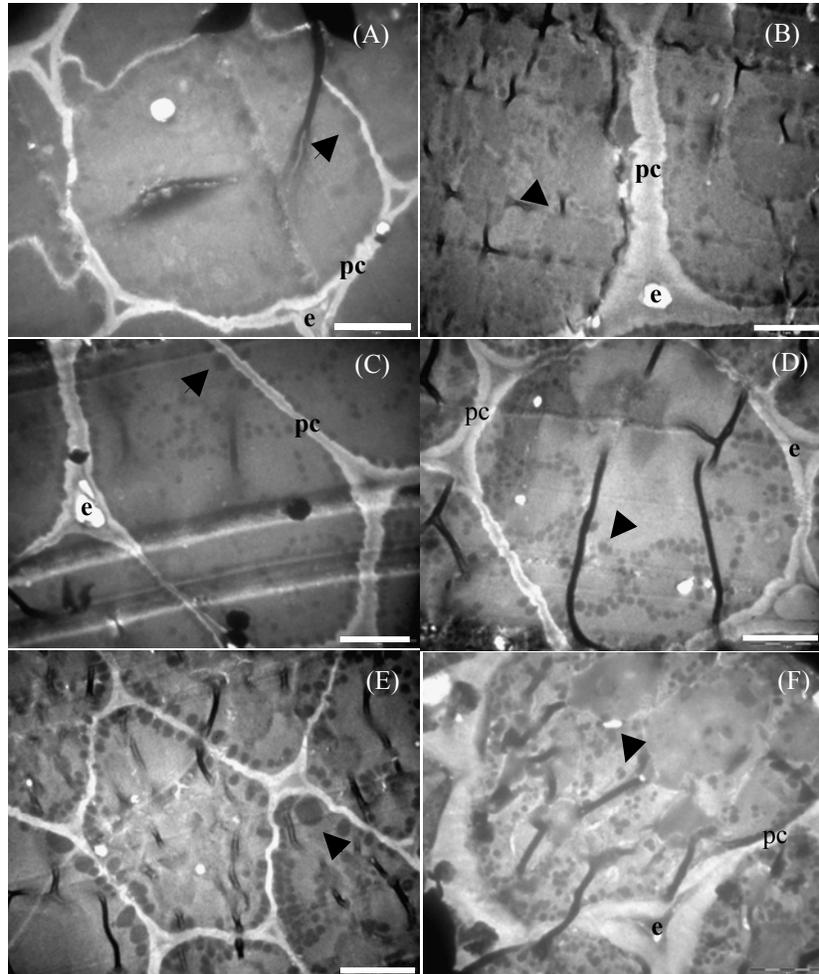


FIGURA 7. Eletromicrografia de eixos embrionários de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, antes do armazenamento (testemunha) (A) e após 30 dias em nitrogênio líquido (-196°C) (B), a -80°C (C), a -20°C (D) e a -196°C, com uso de glicerol a 15% (E) e DMSO a 15% (F). Barra correspondente a 2,0 μm (pc: parede celular e: espaço intercelular, setas: gotículas de lipídios). UFLA, Lavras, MG, 2008.

6 CONCLUSÕES

O comportamento das sementes de *A. colubrina* é ortodoxo quanto à tolerância ao congelamento.

A conservação de eixos embrionários dessa espécie *A. colubrina* em temperaturas inferiores a zero não requer uso de crioprotetores químicos e propicia elevada percentagem de regeneração no cultivo *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.A.C. Crioconservação de sementes na manutenção de banco de germoplasma. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA, 2006. 1 CD-ROM.

ALVES, E. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura.** Lavras: UFLA, 2004. 51 p.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D. J.; WESLEYSMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N. W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 140–155.

BORGES, E. E. L.; MORAES, G. H. K.; CÂNDIDO, J. F.; REIS, F. P.; SILVA, D. Mobilização de reservas em sementes de angico-vermelho (*Piptadenia peregrina* Benth.) e armazenamento em diferentes recipientes e condições de ambientes. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 15, n. 2, p. 126-136, jul./dez. 1991.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CHO, E. G.; NOOR, N. M.; KIM, H. H.; RAO, V. R.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *Citrus aurantifolia* seeds and embryonic axes using a

desiccation protocol. **Cryo Letters**, Jena, v. 23, n. 5, p. 309-316, Sept./Oct. 2002.

COELHO, R. R. P.; MATA, M. E. R. M. C. **Teor de umidade limite para criopreservação de sementes de algodão colorido**. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/391.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2008.

DANTAS, B. F.; SANTOS, G. C.; SANTOS, J. S.; SIMÕES, C. A.; ARAGÃO, C. A. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de angico armazenadas em diferentes tipos de embalagens e ambientes. **Informativo ABRATES**, Pelotas, v. 15, n. 1/3, p. 280, ago. 2005.

BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; VIEIRA, M. das G. G. C.; HILHORST, H. W. M. Aquisição da tolerância à dessecação nos diferentes estádios de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 673-681, jul./ago. 2002.

DINIZ, C. E. F.; PAES, J. B.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 8., 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SBS/SBEF, 2003. 1 CD-ROM.

DINIZ, P. S. C. **Qualidade fisiológica das sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas a diferentes técnicas de criopreservação**. 1999. 80 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande.

DINIZ, P. S. C.; MATA, M. E. R. M.C.; BRAGA, M. E. D. Influência das técnicas de descongelamento na qualidade fisiológica de sementes de milho criopreservadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 1, n. 1, p. 1-12, 1999.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Berlin, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: WUV-Universitätsverlag, 1997. p. 80-90

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

DUMET, D.; BENSON, E. E. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: JIRCAS; Rome: IPGRI, 2000. p. 43-56.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 112, p. 9-18, 1997.

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation/dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 413-426, Nov./Dec. 1990.

FAIAD, M. G. R. **Recursos Genéticos: estratégias e resultados da conservação de germoplasma-semente a longo prazo**. Disponível em: <http://www.giacometti.org.br/htm/artigo_exibe_impressao.cfm?Id=64>.

FARIA, J. M. R. **Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds**. 2006. Tese (Doutorado) - Wageningen University, Wageningen.

FARIA, J. M. R.; DAVIDE, L. C.; SILVA, E. A. A. da; DAVIDE, A. C.; PEREIRA, R. C.; LAMMEREN, A. A. M. V.; HILHORST, H. W. M. Physiological and cytological aspects of *Inga vera* subsp. *affinis* embryos during storage. **Brazilia Journal Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 4, p. 503-513, Nov./Dec. 2006.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

FLECK, R. A.; DAY, J. G.; CLARKE, K. J.; BENSON, E. E. elucidativa of the metabolic and structural basis for the cryopreservation recalcitrance of *Varicheria sessilis*. **CryoLetters**, London, n. 20, n. 5, p. 271-282, Sept./Oct. 1999.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDON, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, Washington, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, 1983.

GOMES, A. P. S.; LOPES, J. C.; CAPUCHO, M. T. Estudo das características físicas e viabilidade de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan – *Fabaceae-Mimosoideae*) durante o

armazenamento. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v.7, n.1, 2, p.70, jul./ago. 1997.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. Pirassununga: RAF, 2004. 92 p.

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

HARDING, K.; BENSON, E. E.; CLACHER, K. Plant conservation biotechnology: an overview. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**, May/June, 1997.

HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic, 1972. v. 3, p. 145-245.

HELLMANN, M. E.; MELLO, J. I. O.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; BARBEDO, C. J. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-101, jan./mar. 2006.

HINCHA, D. K.; DEVRIES, A. L.; SCHMITT, J. M. Cryotoxicity of antifreeze proteins and glycoproteins to spinach thylakoid membranes—comparison with cryotoxic sugar acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1146, n. 2, p. 258–264, Mar. 1993.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Geneflow**: a publication about the earth's plant genetic resources. Rome, 1993. p. 19.

CHAPPELL JUNIOR, J. H. **Is oxidative stress the cause of death when recalcitrant spartina alterniflora seeds are dried** 2008. 186 p. Tese (Doutorado) – Louisiana State University, Louisiana. Disponível em: <<http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-04092008-102559/unrestricted/chappelldiss.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2008.

KAGEYAMA, P. Y.; VIANA, V. M. Tecnologia de sementes e grupos ecológicos de espécies arbóreas tropicais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE TECNOLOGIA DE SEMENTES FLORESTAIS, 2., 1989, São Paulo. **Trabalho...** Piracicaba: ESAL/USP, 1989. 19 p.

KARNOVISKY, M. J. A. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 2, p. 137A-138A, 1965.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K.K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC, 1985. p. 115-134.

KYRYCHENKO, A.; DYUBKO, T. S. Molecular dynamics simulations of microstructure and mixing dynamics of cryoprotective solvents in water and in the presence of a lipid membrane. **Biophysical Chemistry**, v. 136, p. 23–31, 2008.

LEZCANO, M.; GRANJA, C.; SALAZAR, M. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Cryobiology**, v. 48, p. 349–356, 2004.

LLOYD, G.; COWN, B. M. C. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, June 1980.

LOPES, K. P. Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro. 2005. 131 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

LOPES, K. P.; ALMEIDA, F. de A. C.; CARVALHO, M. J. F. C.; BRUNO, R. de L. A. Protocolo para crioconservação de mamona (*Ricinus communis* L.). CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, ENERGIA SUSTENTABILIDADE, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileira**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992. 352 p.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARQUES, M. A. **Secagem e armazenamento de sementes de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Bentham) Altschul e *A. colubrina* (Velloso) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 2007. 124 p. Tese (Doutorado

em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

MARTÍNEZ-MONTERO, M. E.; MORA, N.; QUIÑONES, J.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F.; LORENZO, J. C. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum* sp.) embryogenic calluses. **CryoLetters**, London, v. 23, n. 4, p.237-244, july/Aug. 2002.

MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 3, p. 72-81, dez. 2006.

NÓBREGA, M. B. de M.; ANDRADE, F. P.; SANTOS, J. W.; LEITE, E. J. Germoplasma. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 350 p.

PAES, J. B.; MARINHO, I. V.; LIMA, R. A. de; LIMA, C. R. de; AZEVEDO, T. K. B. de. Viabilidade técnica dos taninos de quatro espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro no curtimento de peles. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 453-462, out./dez. 2006.

RAJASEKARAN, R. P.; BALAMURUGAN; C. R. Effect of mid-storage treatments on longevity of niger seeds. **Madras Agricultural Journal**, Coimbatore, v. 92, n. 7-9, p. 568-570, July/Sept. 2005.

REIS, A. M. M.; CUNHA, R. da. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de sementes de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. com diferentes conteúdos de umidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 10, p. 1071-1079, out. 1997.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

RODRIGUES, A. C. da C. **Biometria de frutos e sementes, germinação e crescimento do angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul) em diferentes condições de substrato e luminosidade**. Feira de Santana, 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wrinkle free section on formvar-coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 151-155, 1975.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1995. p. 53-69.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OJIMAL, I. Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Report**, New York, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990.

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

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de *Citrus* usando o encapsulamento e desidratação**. 23 p. (Documentos, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 115), 2004.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 70-84, dez. 2000. Especial.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R. C.; RIBEIRO, F. N. S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)**. Brasília: Embrapa, 2002. 4 p. (Comunicado Técnico, n. 69).

SOARES, M. P.; ROSSI, C. A. R.; MEZZALIRA, A. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 649-655, 2002.

SROR, H.A.M.; TISCHENDORF, G.; SIEG, F.; SCHMITT, J. M.; HINCHA, D. K. Cryoprotectin protects thylakoids during a freeze-thaw cycle by a mechanism involving stable membrane binding. **Cryobiology**, San Diego, v. 47, n. 3, p. 191-203, Dec. 2003.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In: KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Rotan: CRC, 1985. p. 199-225.

STANWOOD, P. C.; BASS, L. N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 9, n. 2, p. 423-437, 1981.

STANWOOD, P. C.; ROOS, E. E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **HortScience**, Alexandria, v. 14, n. 5, p. 628-530, 1979.

- STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of Apple (*Malus* species) Genetic Resources. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. New York : Springer-Verlag; Berlin: Heidelberg, 1995. v. 32, p. 87-101.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- THEILADE, I.; PETRI, L. **Conservation of tropical trees *ex situ* through storage and use**. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre/IPGRI, 2003. (Guidelines and Technical Notes, 65)
- VARGAS; D. P.; ROCHA, C. L.; ROCHA, B. H. G.; DODE, L. B.; BOBROWSKI, V. L. **Efeito do glicerol como pré-condicionante na criopreservação de sementes de *Origanum vulgare* L.** Pelotas: UFPel, 2004.
- VARGHESEA, B.; NAITHANIB, S. C. Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, n. 7, p. 755-765, 2008.
- VENZKE, T. S. L.; CROCHEMORE, A. G.; LOPES, A. M.; VARGAS, G. M.; BRANDÃO, R. K.; PEREIRA, E. M.; DODE, L. B. Germinação de sementes crioconservadas de diferentes espécies vegetais. Disponível em: <http://www.ufpel.br/cic/2006/arquivos/CB_00983.rtf>. Acesso em: 01 jul. 2008.
- VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biociência e Desenvolvimento**. Brasília, v.3, n. 14, p. 18-20, maio/jun. 2000.
- VILELA, E. A.; RAMALHO, M. A. P. Análise das temperaturas e precipitações pluviométricas de Lavras, Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 71-79, já./jun. 1979.
- WESLEYSMITH, J.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W. Ultrastructural evidence for the effects of freezing in embryonic axes of *Psium sativum* L. At various water contents. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 1, p. 59-64, July 1995.
- WETZEL, M. M. V. S.; REIS, R. B.; RAMOS, K. M. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 26, set. 2003.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 297-330.

WITTMANN, M. T. S. Determinação da quantidade de dna nuclear em plantas.
Ciência Rural, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 897-902, set./out. 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a possibilidade de criopreservação como uma alternativa viável para a conservação de eixos embrionários de sementes de *Anadenanthera colubrina*.

Este trabalho acrescenta informações novas e relevantes para a fisiologia da germinação das sementes, que poderão contribuir para a elaboração de protocolos visando à conservação de germoplasma de espécies nativas.

ANEXOS A

		Pág.
Tabela 1A	Análise de Deviance para as variáveis contaminação, oxidação e germinação de eixos embrionários expostos a diferentes tempos aos desinfestantes (NaOCl e Paraformaldeído). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	205
Tabela 2A	Análise de variância para comprimento da maior raiz formada em plântulas <i>in vitro</i> , cultivadas em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA ₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	205
Tabela 3A	Análise de Deviance para o número de raízes secundárias formadas em plântulas <i>in vitro</i> de <i>A. colubrina</i> , em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA ₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	206
Tabela 4A	Análise de Deviance para formação de calos na raiz de plântulas <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA ₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	206
Tabela 5A	Análise de variância para comprimento de parte aérea de plântulas <i>in vitro</i> , em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA ₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	207
Tabela 6A	Análise de Deviance para contagem de número de brotações formadas em plântulas <i>in vitro</i> , em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA ₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	207
Tabela 7A	Análise de variância para comprimento da maior brotação de plântulas <i>in vitro</i> , em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA ₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	208

Tabela 8A	Análise de Deviance para o número de gemas formadas em plântulas <i>in vitro</i> de <i>A. colubrina</i> , em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA ₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	208
Tabela 9A	Análise de Deviance para a proporção de abscisão foliar em plântulas <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA ₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	209
Tabela 10A	Análise de variância para comprimento da raiz principal de plântulas <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	209
Tabela 11A	Análise de Deviance para formação de calos nas raízes de plântulas <i>in vitro</i> , em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	210
Tabela 12A	Análise de variância para comprimento de parte aérea de plântulas <i>in vitro</i> , em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentração de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	210
Tabela 13A	Análise de Deviance para contagem de número de brotações em plântulas <i>in vitro</i> em função dos diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	211
Tabela 14A	Análise de variância para comprimento da maior brotação em plântulas <i>in vitro</i> , em função dos diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	211
Tabela 15A	Análise de Deviance para o número de gemas em plântulas <i>in vitro</i> , em função dos diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	212

Tabela 16A	Análise de Deviance para abscisão foliar em plântulas <i>in vitro</i> de <i>A. colubrina</i> , em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	212
Tabela 17A	Análise de variância para comprimento da maior brotação em segmentos nodais de <i>A. colubrina</i> inoculados em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0mg L ⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	213
Tabela 18A	Análise de Deviance para número de brotações por segmento nodal de <i>A. colubrina</i> , inoculado em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L ⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	213
Tabela 19A	Análise de Deviance para número de gemas por segmento nodal de <i>A. colubrina</i> , inoculado em meio de cultura MS, suplementado com concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L ⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	214
Tabela 20A	Análise de deviance para proporção de formação de calos na base do explante, inoculado em meio de cultura MS, suplementado com concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0mg L ⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1; 1,0mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.....	214

TABELA 1A. Análise de Deviance para as variáveis contaminação, oxidação e germinação de eixos embrionários expostos, por diferentes tempos, aos desinfestantes (NaOCl e paraformaldeído). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)		
		Contaminação	Oxidação	Plântulas
Desinfestantes	1	11,27 (<i>p</i> =0,0008)	56,05 (<i>p</i> <0,0001)	59,71 (<i>p</i> <0,0001)
Tempos de exposição dentro de Desinfestantes	5	18,15 (<i>p</i> =0,0028)	6,92 (<i>p</i> =0,2267)	0,57 (<i>p</i> =0,9892)
Resíduo	63	50,38	25,68	36,53

TABELA 2A. Análise de variância para comprimento da maior raiz formada em plântulas *in vitro*, cultivadas em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio (valor <i>p</i>)
Meios de cultura (M)	1	29,1218 (<i>p</i> =0,0009)
Concentrações (C)	4	17,6461 (<i>p</i> <0,0001)
M x C	4	12,5740 (<i>p</i> =0,0009)
Erro	139	2,5281
CV (%)		42,72
¹ Pr < W		0,0792

¹ Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

TABELA 3A. Análise de Deviance para o número de raízes secundárias formadas em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Número de raízes secundárias
Meios de cultura (M)	1	27,34 (<i>p</i> <0,0001)
Concentrações (C)	4	42,24 (<i>p</i> <0,0001)
M x C	4	46,93 (<i>p</i> <0,0001)
Resíduo	138	580,41
Total	147	696,92

TABELA 4A. Análise de Deviance para formação de calos na raiz de plântulas *in vitro* em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Formação de calos na raiz
Meios de cultura (M)	1	41,54 (<i>p</i> <0,0001)
Concentrações (C)	4	31,89 (<i>p</i> <0,0001)
M x D	4	0,0 (<i>p</i> =0,9999)
Resíduo	140	64,91
Total	149	138,34

TABELA 5A. Análise de variância para comprimento de parte aérea de plântulas *in vitro*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Graus de liberdade	¹ Quadrado médio (valor <i>p</i>)
Meios de cultura (M)	1	0,0308 (<i>p</i> =0,6710)
Concentrações (C)	4	0,1093 (<i>p</i> =0,6322)
M x C	4	0,2836 (<i>p</i> =0,1635)
Erro	91	0,1697
CV (%)		32,30
² Pr < W		0,0781

¹ Valores transformados por \sqrt{y} ; ² Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

TABELA 6A. Análise de Deviance para contagem de número de brotações formadas em plântulas *in vitro*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Número de brotações
Meios de cultura (M)	1	21,48 (<i>p</i> <0,0001)
Concentrações (C)	4	6,12 (<i>p</i> =0,1903)
M x C	4	10,87 (<i>p</i> =0,0281)
Resíduo	140	109,37
Total	149	147,84

TABELA 7A. Análise de variância para comprimento da maior brotação de plântulas *in vitro*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Graus de liberdade	¹ Quadrado médio (valor <i>p</i>)
Meios de cultura	1	2,5724 (<i>p</i> =0,0030)
Concentrações dentro de meio	7	0,1369 (<i>p</i> =0,8073)
Erro	41	0,2588
CV (%)		30,81
² Pr < W		0,2797

¹ Valores transformados por \sqrt{y} ; ² Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

TABELA 8A. Análise de Deviance para o número de gemas formadas em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Número de gemas
Meios de cultura (M)	1	148,35 (<i>p</i> <0,0001)
Concentrações (C)	4	9,09 (<i>p</i> =0,0591)
M x C	4	50,67 (<i>p</i> <0,0001)
Resíduo	140	214,14
Total	149	451,25

TABELA 9A. Análise de Deviance para a proporção de abscisão foliar em plântulas *in vitro*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de GA₃ (0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Abscisão foliar
Meios de cultura (M)	1	0,25 (<i>p</i> =0,6180)
Concentrações (C)	4	5,75 (<i>p</i> =0,2189)
M x C	4	11,63 (<i>p</i> =0,0203)
Resíduo	140	185,06
Total	149	202,69

TABELA 10A. Análise de variância para comprimento da raiz principal de plântulas *in vitro*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Graus de liberdade	¹ Quadrado médio (valor <i>p</i>)
Meios de cultura (M)	1	7,8697 (<i>p</i> <0,0001)
Concentrações (C)	4	0,5893 (<i>p</i> <0,0001)
M x C	4	0,1109 (<i>p</i> =0,1076)
Erro	130	0,0572
CV (%)		18,78
² Pr < W		0,2128

¹ Valores transformados por $\log(y)$; ² Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

TABELA 11A. Análise de Deviance para formação de calos na raízes de plântulas *in vitro*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Formação de calos na raiz
Meios de cultura (M)	1	13,41 (<i>p</i> =0,0003)
Concentrações (C)	4	15,83 (<i>p</i> =0,0033)
M x C	4	17,26 (<i>p</i> =0,0017)
Resíduo	140	158,21
Total	149	204,71

TABELA 12A. Análise de variância para comprimento de parte aérea de plântulas *in vitro*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentração de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Graus de liberdade	¹ Quadrado médio (valor <i>p</i>)
Meios de cultura (M)	1	6,9531 (<i>p</i> <0,0001)
Concentrações (C)	4	1,0381 (<i>p</i> =0,0449)
M x C	4	1,3789 (<i>p</i> =0,0125)
Erro	105	0,4106
CV (%)		43,02
² Pr < W		0,0592

¹ Valores transformados por \sqrt{y} ; ² Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

TABELA 13A. Análise de Deviance para contagem de número de brotações em plântulas *in vitro*, em função dos diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Número de brotações
Meios de cultura (M)	1	19,09 (<0,0001)
Concentrações (C)	4	10,69 (0,0303)
M x C	4	2,51 (0,6433)
Resíduo	140	171,55
Total	149	203,84

TABELA 14A. Análise de variância para comprimento da maior brotação em plântulas *in vitro*, em função dos diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Graus de liberdade	¹ Quadrado médio (valor <i>p</i>)
Meios de cultura (M)	1	2,4006 (<i>p</i> =0,0303)
Concentrações (C)	4	0,5044 (<i>p</i> =0,3996)
M x C	4	0,1729 (<i>p</i> =0,8418)
Erro	70	0,4912
CV (%)		38,97
² Pr < W		0,0780

¹ Valores transformados por \sqrt{y} ; ² Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

TABELA 15A. Análise de Deviance para o número de gemas em plântulas *in vitro*, em função dos diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Número de gemas
Meios de cultura (M)	1	8,67 (<i>p</i> =0,0032)
Concentrações (C)	4	40,19 (<i>p</i> <0,0001)
M x C	4	27,91 (<i>p</i> <0,0001)
Resíduo	140	408,52
Total	149	485,30

TABELA 16A. Análise de Deviance para abscisão foliar em plântulas *in vitro* de *A. colubrina*, em diferentes meios de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Abscisão foliar
Meios de cultura (M)	1	2,01 (<i>p</i> =0,1558)
Concentrações (C)	4	4,27 (<i>p</i> =0,3713)
M x C	4	1,05 (<i>p</i> =0,9027)
Resíduo	140	177,80
Total	149	184,92

TABELA 17A. Análise de variância para comprimento da maior brotação em segmentos nodais de *A. colubrina* inoculados em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Graus de liberdade	¹ Quadrado médio (valor <i>p</i>)
BAP	5	0,9726 (<i>p</i> =0,0027)
ANA	3	0,1625 (<i>p</i> =0,5835)
BAP x ANA	15	0,3526 (<i>p</i> =0,1533)
Erro	109	0,24931
CV (%)		37,03
² Pr < W		0,1475

¹ Valores transformados por \sqrt{y} ; ² Teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

TABELA 18A. Análise de Deviance para número de brotações por segmento nodal de *A. colubrina*, inoculado em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Número de brotações
BAP	5	15,51 (<i>p</i> =0,0084)
ANA	3	32,84 (<i>p</i> <0,0001)
BAP x ANA	15	18,65 (<i>p</i> =0,2301)
Resíduo	216	148,39
Total	239	215,39

TABELA 19A. Análise de Deviance para número de gemas por segmento nodal de *A. colubrina*, inoculado em meio de cultura MS, suplementado com concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Número de gemas
BAP	5	94,49 (<i>p</i> <0,0001)
ANA	3	76,94 (<i>p</i> <0,0001)
BAP x ANA	15	59,38 (<i>p</i> <0,0001)
Resíduo	216	485,14
Total	239	686,53

TABELA 20A. Análise de deviance para proporção de formação de calos na base do explante, inoculado em meio de cultura MS, suplementado com concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,01; 0,1; 1,0mg L⁻¹). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	Gl	Deviances (valor <i>p</i>)
		Formação de calos na base do explante
BAP	5	54,45 (<i>p</i> <0,0001)
ANA	3	27,95 (<i>p</i> <0,0001)
BAP x ANA	15	5,09 (<i>p</i> =0,9913)
Resíduo	216	81,33
Total	239	168,82

ANEXOS B

		Pág.
Tabela 1B	Composição do meio de cultura MS (Murashige & Shoog, 1962).....	216
Tabela 2B	Composição do meio de cultura WPM (Llody & McCown, 1980).....	217

Tabela 1B – Composição do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962).

COMPONENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83
Micronutrientes		
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .4H ₂ O	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Vitaminas		
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,1
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2,0
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0
Outros		
Ágar		7,0
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30,0

Tabela 2B – Composição do meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980).

COMPONENTE	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	400
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	96
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25
Micronutrientes		
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Sulfato de manganês	MnSO ₄ . H ₂ O	22,3
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
Vitaminas		
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,1
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2,0
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0
Outros		
Ágar		7,0
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30,0