



ANA CRISTINA DE SOUZA

**ORGANOGENESE E CRIOPRESERVAÇÃO
DE *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose**

LAVRAS – MG

2014

ANA CRISTINA DE SOUZA

ORGANOGÊNESE E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Fisiologia Vegetal, para a obtenção do
título de Mestre.

Orientador
Renato Paiva, Ph.D.

Coorientador
Dr. Luciano Coutinho Silva

**LAVRAS – MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Souza, Ana Cristina de.

Organogênese e criopreservação *in vitro* de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose / Ana Cristina de Souza. – Lavras : UFLA, 2014.

88 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Ipê amarelo. 2. Micropropagação. 3. Ipê-amarelo – Sementes – Armazenamento em longo prazo. 4. Ipê-amarelo - Sementes - Sobrevivência pós descongelamento. 5. Ultrabaixa temperatura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.87

ANA CRISTINA DE SOUZA

ORGANOGENESE E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose

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

APROVADA em 19 de fevereiro de 2014.

Prof^ª. Dr^ª. Ana Hortência Fonsêca Castro UFSJ

Dr. Paulo Augusto Almeida Santos UFLA

Renato Paiva, Ph.D.
Orientador

Dr. Luciano Coutinho Silva
Coorientador

**LAVRAS-MG
2014**

*Ao Prof. Renato Paiva, aos amigos da Fisiologia Vegetal e do Laboratório de
Cultura de Tecidos de Plantas*

OFEREÇO

*A minha família
Ao meu namorado Rodrigo Lázaro
E a todos que torceram pela minha vitória*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos “Santos” pela força para que esse sonho hoje fosse realizado.

Aos meus pais, Joaquim e Sílvia, pelo amor incondicional durante todos esses anos, irmãs Lílian e Lívvia, sobrinhos Lucas e Bárbara, primo Chá e tio Cacá, que juntamente com toda a minha família fizeram de mim uma pessoa humilde e batalhadora.

Ao meu namorado, Rodrigo Lázaro, pelo amor e companheirismo sendo minha válvula de escape nos momentos mais difíceis.

Ao Luciano Coutinho, pela orientação, amizade, por toda a paciência e por compartilhar sua imensa sabedoria.

Aos membros da banca Ana Hortência e Paulo Augusto pela colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pela convivência nesses nove anos. Foram tantos que passaram nesses nove anos e deixando um carinho especial por mim, Diogo, Milene, Luciano, Paulo, Vanessa, Padô, Gabriela, Daiane, Nádia, Lenaldo, Stephânia, Maísa, Raírys, Fúlvia, Alvinho, Fernanda Soares, Patrícia Nicioli, Joana, Mariana e Ane pelo carinho e amizade.

Aos queridos amigos da Fisiologia pelo respeito e amizade em especial Lena, Manu, Joel, Barrinha, Odorêncio, Tanhan, as duas Dani e Evaristinho.

Ao Prof. Donizeti pela oportunidade de fazer parte da equipe dos técnicos-administrativos do Setor de Fisiologia Vegetal de onde tudo começou.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal por me possibilitar a realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, agradeço também à FAPEMIG e à CAPES.

E o meu agradecimento mais que especial ao Professor Renato Paiva, pela oportunidade e confiança, de trabalhar no laboratório e desenvolver este trabalho, pela orientação, pelo incentivo e apoio, sem esta oportunidade nada disso seria possível.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Ana Cristina de Souza, filha de Joaquim Antônio Filho e Sílvia Maria de Souza, nasceu em 17 de julho de 1980 em Lavras - MG. Concluiu o ensino médio em 1999, na Escola Estadual Dora Matarazzo. Durante os anos de 2005 a 2012 trabalhou no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, dando apoio técnico-científico aos alunos de pós-graduação sob a orientação do Prof. Renato Paiva. Em fevereiro 2008, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas Licenciatura no Centro Universitário de Lavras concluindo em 17 de dezembro de 2011 recebendo o título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Em março de 2012, iniciou seus estudos no Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal na UFLA concluindo em fevereiro de 2014.

RESUMO GERAL

Handroanthus serratifolius é uma árvore típica do bioma Cerrado. Possui propriedades medicinais, madeireira e ornamental. A cultura de tecidos é uma alternativa para a propagação de plantas e a criopreservação é uma eficiente forma para o armazenamento em longo prazo em nitrogênio líquido (NL) a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os objetivos deste trabalho foram estudar a organogênese *in vitro* e criopreservação de *H. serratifolius*. Embriões zigóticos foram desinfestados por diferentes tempos em hipoclorito de sódio e inoculados em meio MS. Foi investigado o efeito das diferentes concentrações de BAP na indução de brotações e regeneração de ápices em meio WPM. Para a regeneração de brotos a partir de raízes, hipocótilo e radícula foram inoculados em meio WPM acrescido de AIA. No enraizamento e aclimatização, foram avaliados o efeito de diferentes concentrações de AIB. Na criopreservação, foi avaliada a eficiência de diferentes tempos de descongelamento (1, 3 ou 5 minutos) de sementes, com relação à germinação, peso fresco e seco das plântulas. Para a germinação *in vitro*, as sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 2% (P1), ou embriões, desinfestados em hipoclorito de sódio 1% (P2) e inoculados em MS contendo GA_3 . Foi avaliado a porcentagem de germinação e o comprimento da parte aérea de P1 e P2, massa fresca e seca (mg) da parte aérea e raízes de plântulas originadas de P2. Para a criopreservação dos embriões, após a desinfestação e desidratação em câmara de fluxo laminar (0 a 300 min), o material foi armazenado em NL por sete dias, descongelados em banho-maria a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1, 3 e 5 minutos, inoculados em meio MS contendo GA_3 e a porcentagem de germinação e comprimento da parte aérea foram avaliadas. Para a criopreservação dos ápices caulinares, foram testados tempos (0, 15, 30, 60, 120 e 240 min) de imersão em PVS2 a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes da imersão em NL e a retomada do crescimento dos ápices foi avaliada. O uso de hipoclorito de sódio (1%) é eficaz na descontaminação dos embriões. Para a indução de brotações e regeneração de ápices caulinares, o uso de $2\text{ }\mu\text{M}$ de BAP promoveu as melhores respostas. Brotos foram regenerados a partir de segmentos de hipocótilos e raízes com diferença entre os tratamentos. As concentrações de AIB foram eficazes para a indução de raízes. A aclimatização foi eficiente com 100% de plantas aclimatizadas. Um minuto de descongelamento é eficaz para a criopreservação de sementes. Apenas 10% de sementes (P1) germinaram, enquanto embriões (P2) apresentaram 95% de germinação após a criopreservação. Embriões apresentando teor de água inferior a 10% antes da exposição ao NL apresentaram germinação superior a 85%. A máxima taxa de retomada de crescimento de ápices criopreservados foi de 54,8% após a exposição por 30 minutos na solução de PVS2.

Palavras-chave: Ipê amarelo. Micropropagação. Armazenamento em longo prazo. Ultrabaixa temperatura. Sobrevivência pós descongelamento.

GENERAL ABSTRACT

Handroanthus serratifolius tree is typical of the Cerrado biome. Presents medicinal, ornamental and timber properties. The tissue culture is an alternative to the plant propagation and cryopreservation is an efficient way to long-term storage in liquid nitrogen (LN) at -196 ° C. The objectives of this work were to study the *in vitro* organogenesis and the cryopreservation of *H. serratifolius*. For *in vitro* germination, zygotic embryos were decontaminated in sodium hypochlorite for different periods and inoculated in MS medium. The effect of different BAP concentrations on shoot induction and regeneration of apices on WPM medium was investigated. For regeneration of shoots from roots, hypocotyl and radicle segments were inoculated in WPM plus IAA. The effect of different IBA concentrations on rooting and acclimatization were evaluated. For seeds cryopreservation, the efficiency of different thawing times (1, 3 or 5 minutes) regarding to germination, fresh and dry weight of seedling was verified. After cryopreservation, seeds were decontaminated in 2% sodium hypochlorite (P1), or embryos decontaminated with sodium hypochlorite 1% (P2) prior inoculation on MS containing GA₃. The germination percentage and shoot length of P1 and P2, fresh and dry weight (mg) of shoots and roots of seedlings originated from the P2 were investigated. For embryos cryopreservation, after disinfection and dehydration in laminar air flow (0 to 300 min) chamber, the material was stored for seven days in NL, thawed in a water bath to 38 °C for 1 to 5 minutes, inoculated medium MS containing GA₃ and the germination percentage and shoot length were evaluated. For shoot tips cryopreservation, different exposure times (0, 15, 30, 60, 120 and 240 min) on PVS2 at 0 °C, before plunge into LN, and the apices regrowth were evaluated. The use of sodium hypochlorite (1%) is effective in decontaminating embryos. For shoot induction and shoot tips regeneration, 2µM BAP promoted the best results. Shoots were regenerated from hypocotyl and roots segments with difference among treatments. The IBA concentration tested were effective for root induction. Acclimatization was efficient with 100% acclimatized plants. Thawing for one minute is effective for seeds cryopreservation. Only 10% of seeds (P1) germinated, while embryos (P2) presented 95% germination after cryopreservation. Embryos showing water content of less than 10% before exposure to LN presented 85% germination. The higher regrowth rate for cryopreserved shoot tips was 54.8% after exposure for 30 minutes in PVS2 solution.

Keywords: Yellow ipe. Micropropagation. Long term storage. Ultra-low temperature. Post-thaw survival.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 <i>Handroanthus (Tabebuia) [serratifolia] serratifolius</i> (Vahl.) S. O. Grose	14
2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	16
2.3 Organogênese <i>in vitro</i>	17
2.4 Conservação <i>in vitro</i>	18
2.4.1 Criopreservação de sementes e embriões zigóticos	20
2.4.2 Criopreservação de ápices caulinares	21
REFERÊNCIAS	23
CAPITULO 2	30
ORGANOGENESE <i>in vitro</i> EM <i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl). S. O. Grose	30
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Material vegetal	35
2.2 Germinação <i>in vitro</i> e teste de desinfestação dos embriões	35
2.3 Enraizamento de brotações germinadas <i>in vitro</i>	36
2.4 Aclimatização	37
2.5 Regeneração <i>in vitro</i> de brotos a partir de organogênese direta	37
2.6 Indução de brotações <i>in vitro</i> a partir de segmentos caulinares	38
2.7 Enraizamento <i>in vitro</i> das brotações	39
2.8 Crescimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Teste de desinfestação dos embriões	41
3.2 Enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas	42

3.3 Aclimatização	44
3.4 Regeneração <i>in vitro</i> de brotos a partir de organogênese direta	45
3.5 Indução de brotações <i>in vitro</i>	48
3.6 Enraizamento <i>in vitro</i> das brotações	51
3.7 Crescimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares	52
4 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO 3	61
CRIOPRESERVAÇÃO DE <i>Handronathus serratifolius</i>	61
RESUMO	62
ABSTRACT	63
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 Material Vegetal	66
2.2 Criopreservação de sementes	66
2.3 Desidratação e criopreservação de embriões	67
2.3.1 Teste de desidratação de embriões	67
2.3.2 Criopreservação de embriões	68
2.4 Criopreservação de ápices caulinares	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1 Criopreservação de sementes	71
3.2 Criopreservação de embriões	76
3.2.1 Teste de desidratação dos embriões	76
3.2.2 Criopreservação de embriões	77
3.3 Criopreservação de ápices caulinares	81
4 CONCLUSÕES	83
PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS	85

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado ocupa uma área de 24% do território brasileiro (IBGE, 2011), é o segundo maior e mais ameaçado bioma do Brasil e de acordo com previsões do Centro Nacional de Recursos Genéticos da Embrapa (CENTRO NACIONAL RECURSOS GENÉTICOS - CENARGEN, 2005) há uma indicação do seu fim até 2030 se a taxa de desmatamento continuar, devido principalmente à agricultura intensiva, às queimadas e ao crescimento não planejado das áreas urbanas. Até o ano de 2005, 57% de toda sua área já havia sido antropizada e a taxa de desmatamento anual chegava a 1,5% (três milhões de hectares/ano) (CENARGEN, 2005).

Dentre as espécies que crescem no bioma Cerrado, está *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose, popularmente conhecida como ipê amarelo, uma espécie arbórea que apresenta interesse econômico devido a sua madeira, que pode ser usada em carpintaria e na construção civil, além disso tem grande potencial ornamental por produzir uma exuberante florada amarela (FERREIRA et al., 2004). A espécie também é utilizada na medicina popular por possuir propriedades anti-infecciosas, antifúngicas, diurética, adstringente e ainda apresenta efeito contra alguns tipos de câncer, lúpus, doença de Parkinson, psoríase e alergias. (EVANGELISTA JUNIOR et al., 2006). A espécie produz sementes ortodoxas, entretanto estas perdem a viabilidade dependendo das condições de armazenamento (SOUZA, 2005; OLIVEIRA et al., 2005; SANTOS et al., 2009; SILVA, et al., 2011). Desta forma, metodologias de propagação assexuada podem se configurar como uma alternativa para uma produção em larga escala.

A Cultura de tecidos tem contribuído para a propagação de espécies nativas (PÊGO; PAIVA; PAIVA et al., 2013) e é uma técnica aplicada com diversas finalidades, sendo a micropropagação a mais praticada, pois permite a multiplicação *in vitro* em larga escala a partir de pequenos fragmentos de uma planta (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; PINHAL et al., 2011). A

micropropagação, compreende diversas etapas, desde o estabelecimento inicial do explante *in vitro* passando pela multiplicação, enraizamento até aclimatização da microplanta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; BASTOS et al., 2007). O cultivo *in vitro* pode, portanto, fornecer materiais vegetais propagados assexuadamente independentemente da época do ano. Entretanto, alternativas de conservação desses produtos biotecnológicos em longo prazo são necessárias.

A criopreservação é uma técnica utilizada para a conservação de várias espécies vegetais pelo armazenamento por longos períodos (CHEN et al., 2011). O desenvolvimento de um protocolo de criopreservação aplicado à espécie *H. serratifolius* mostra-se como uma alternativa com grandes potencialidades para a conservação em longo prazo, de produtos de interesse como por exemplo clones de elite.

O uso de técnicas de criopreservação de ápices caulinares por *droplet vitrification* (PANIS, 2005), além da criopreservação de embriões zigóticos por desidratação e congelamento (PANIS; LAMBARDI, 2005; KAVIANI, 2011) podem garantir a formação de um criobanco de material clonal e de acessos de *H. serratifolius*, respectivamente.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi induzir a organogênese *in vitro* e testar a eficácia de técnicas da criopreservação visando à conservação em longo prazo de *Handroanthus serratifolius*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Handroanthus (Tabebuia) [serratifolia] serratifolius* (Vahl.) S. O. Grose

Handroanthus serratifolius (Vahl) S. O. Grose, espécie pertencente à família Bignoniaceae é uma árvore que atinge até 25 m de altura. Conhecida no Brasil como ipê, ipê-amarelo, ipê-do-cerrado, ipê-ovo-de-macuco, pau-d'arco-amarelo e piúva-amarela é amplamente distribuída na América do Sul, com registros na Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. No Brasil, estende-se da Amazônia até São Paulo, e é encontrada em diferentes

biomas, incluindo Floresta Tropical e Cerrado (GENTRY, 1992; FERREIRA et al., 2004).

Estudos moleculares revelaram que o gênero *Tabebuia* é um grupo polifilético. Sendo assim, aquelas espécies de *Tabebuia* que são caracterizadas por ter madeira extremamente densa contendo grandes quantidades de lapachol, foram colocadas no gênero *Handroanthus*. Portanto, *Handroanthus serratifolius* (Vahl.) S. O. Grose é o nome proposto em um dos rearranjos taxonômicos para a espécie *Tabebuia serratifolia* (GROSE; OLMSTEAD, 2007).

O ipê-amarelo possui interesse ornamental e medicinal. Tem valor ornamental (LORENZI 1992) pois a árvore é utilizada em paisagismo e arborização urbana por causa de suas flores amarelas (FERREIRA et al., 2004; DOUSSEAU et al., 2008). Na indústria farmacêutica, é utilizado para uma variedade de propósitos (GENTRY 1992; LORENZI 1992), incluindo estudos relacionados com o câncer (SALUSTIANO et al., 2010). É utilizado na medicina popular no tratamento de câncer do pâncreas, esôfago, intestino, pulmões, próstata e língua, além de ser empregado na doença de Hodgkin, leucemia, lúpus, doença de Parkinson, psoríase e alergias. Ainda apresenta propriedades analgésica, diurética e fungicida sendo utilizado em medicamentos caseiros para furúnculos, clorose, diarreia, disenteria, enurese, febre, faringite, picada de cobra, sífilis e feridas. (EVANGELISTA JUNIOR et al., 2006).

Sua floração exuberante de flores amarelas a torna um elemento altamente visível na paisagem e, devido à beleza de suas flores e ampla distribuição, foi designada a flor nacional do Brasil sendo o emblema da Sociedade Brasileira de Botânica (GENTRY 1992; ALVES et al., 2013). Florescem de julho a outubro no Brasil, seus frutos amadurecem rapidamente e liberam as sementes aladas durante a estação seca ou no início das chuvas, de setembro a dezembro (LORENZI, 1992; RODRIGUES, et al., 2012) (Figura 1).



Figura 1 *H. serratifolius* durante o período de florescimento (A), sementes (B) e embriões zigóticos (C). Barra = 10mm. Fonte: Botelho e Souza, 2013.

As sementes do ipê possuem germinação epígea, não possuem dormência e possuem baixa longevidade em ambiente natural. Porém, foram classificadas como ortodoxas e, portanto, podem ser armazenadas sob refrigeração, em embalagens impermeáveis, após a secagem (FERREIRA et al., 2004; SILVA et al., 2011). A propagação é feita por sementes que são produzidas em síliqua e em grandes quantidades (OLIVEIRA et al., 2004, 2005; DOSSEAU et al., 2008).

2.2 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* é o cultivo de células, tecidos e órgãos isolados da planta mãe em um meio artificial. É utilizado em diversas áreas de pesquisas, incluindo a micropropagação, que permite a propagação de plantas idênticas à planta mãe. Com a utilização desta técnica, as plântulas podem ser obtidas de três formas: cultura de gemas ou meristemas,

organogênese e embriogênese somática (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; PINHAL et al., 2011).

A micropropagação envolve etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até a fase de aclimatização. O sucesso da micropropagação vai depender da capacidade das plântulas de sobreviverem após a transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, sem grandes perdas (HAZARIKA, 2006).

Dentre alguns fatores, a utilização de reguladores de crescimento, nutrientes disponíveis no meio de cultura e o ambiente de crescimento (fotoperíodo, a qualidade da luz e a temperatura), podem afetar o sucesso do cultivo *in vitro* (PINHAL et al., 2011).

George et al. (2008) relataram que o balanço entre as auxinas e as citocininas influenciam no desenvolvimento do explante, e afirmam que são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas.

As citocininas estão relacionadas com a indução de brotos, promovendo a quebra da dormência das gemas laterais desenvolvendo assim um papel crucial em muitas fases do crescimento e desenvolvimento das plantas (GEORGE et al., 2008). Já as auxinas estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento das plantas e são utilizadas para a indução de raízes adventícias (SAINI et al., 2013).

2.3 Organogênese *in vitro*

Organogênese e embriogênese somática são rotas morfogenéticas distintas que as células cultivadas *in vitro* podem seguir (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Na organogênese as células se desenvolvem em uma estrutura unipolar podendo ser um ápice caulinar ou radicular. Esta via de regeneração pode ocorrer de forma direta, a partir do tecido do explante com potencial morfogenético, ou pela via indireta, que acontece com o desenvolvimento de

calos que diferenciam-se em gemas adventícias ou raízes. (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998)

Para que a organogênese *in vitro* aconteça é preciso uma interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (fitohormônios) e os reguladores de crescimento, os quais são adicionados ao meio de cultura (SOARES et al., 2007).

A organogênese é geralmente composta por três fases distintas dependentes de fitormônios. Na primeira fase as células são desdiferenciadas para adquirir competência organogênica, na segunda fase, as células indiferenciadas são induzidas para a rota morfogênica em resposta ao fitormônios exógenos, e na terceira fase é a formação do órgão, fase esta que é independente de fitormônios exógenos uma vez que o estímulo já foi dado (SUGIYAMA, 1999).

2.4 Conservação *in vitro*

Conservação *in vitro* é a manutenção de material biológico em condições assépticas. Pode ocorrer de duas formas, criopreservação ou crescimento lento. O crescimento lento é uma técnica de conservação em médio prazo podendo ser atingida através de alterações no meio de cultura e/ou ambiente de cultivo, dessa forma reduzindo a taxa de crescimento dos explantes. Já a criopreservação é definida como o armazenamento de material biológico vivo em temperaturas ultrabaixas, é uma técnica para a conservação em longo prazo e considerada viável para uma série de espécies que apresentam dificuldades de armazenamento pelos métodos tradicionais (ENGELMANN, 2004; 2011).

De acordo com Engelman (2004), em temperaturas como a do nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, os processos metabólicos são interrompidos permitindo o armazenamento por um período ilimitado sem que haja alterações no material armazenado. Uma outra vantagem da técnica é o

pequeno espaço para o armazenamento de uma grande quantidade de material.

O sucesso da criopreservação depende da não formação de cristais de gelo no interior dos tecidos (PANIS et al., 2005; ENGELMANN, 2011). A desidratação é importante para a prevenção da formação desses cristais de gelo intracelular, que podem ocorrer durante o resfriamento e reaquecimento causando lesões nas células (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). A desidratação do material vegetal tem que ser a um teor de umidade baixo para evitar a formação de cristais, mas que não cause à desidratação severa das células (SANTOS, 2001). Um bom nível de sobrevivência geralmente é obtido quando as amostras são resfriadas com umidade entre 10 e 20% (ENGELMANN, 2004).

Vários tipos de explantes como embriões zigóticos (ISHIKAWA et al., 1997; STEINMACHER et al., 2007; WEN; WANG et al., 2010), embriões somáticos (MYCOCK et al., 1995; FERNANDES et al., 2008; POPOVA; KIM; PAEK et al., 2010), ápices caulinares (SARKAR et al., 1998; VOLK.; WALTERS; WHEELER; STANWOOD et al., 2006; UCHENDU et al., 2010), meristemas (PANIS et al., 2009) e suspensões celulares (MENGES et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2006) já foram utilizados com sucesso para a criopreservação de diversas espécies vegetais.

No congelamento lento (criopreservação clássica) a desidratação é induzida durante o congelamento e no resfriamento rápido (contemporâneas), a desidratação é baseada na vitrificação (ENGELMANN, 2004).

Na vitrificação, a desidratação normalmente acontece mediante a exposição da amostra a um meio com alta concentração de soluções crioprotetoras. Assim, a maior parte da água intracelular é retirada antes do resfriamento da amostra. Após a desidratação é feito o congelamento rápido do material pela imersão em nitrogênio líquido induzindo a vitrificação dos solutos internos (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). A indução à tolerância

à dessecação do explante é uma etapa crítica da técnica e são utilizados os crioprotetores (PANIS; LAMBARDI, 2005).

As substâncias crioprotetoras devem ter a capacidade de penetrar nas células e, ao mesmo tempo, não serem tóxicas. A penetração dessas substâncias contribui para uma maior osmolaridade. Entre essas substâncias estão o glicerol, o dimetilsulfóxido e o metanol (BENSON, 2008).

SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA et al. (1990) desenvolveram a solução de vitrificação PVS2 que é composta de glicerol, etileno glicol e dimetilsulfóxido (DMSO), sacarose que, atualmente é a mais utilizada nos processos de criopreservação (SAKAI et al., 2008).

2.4.1 Criopreservação de sementes e embriões zigóticos

Sementes ortodoxas podem ser desidratadas ao teor de água inferior a 7%, sem grande perda de viabilidade, sementes intermediárias podem resistir à desidratação considerável, mas não ao nível das sementes ortodoxas e, sementes recalcitrantes perdem a sua viabilidade, mesmo quando secas ao teor de água entre 20 a 30% (ROBERTS, 1973; PRITCHARD, 2004).

Protocolos de conservação de sementes têm que ser adequados para cada tipo de semente, por exemplo, protocolos para sementes ortodoxas não podem ser utilizados para sementes recalcitrantes e intermediárias (ENGELMANN, 1991, 1997; SANTOS, 2000).

A criopreservação de sementes ortodoxas já foi realizada para algumas espécies (PENICE, 1991; WALTERS; WHEELER; STANWOOD, 2004), porém em alguns estudos, outros autores observaram problemas após a criopreservação, como germinação anormal ou morte (SHIBATA; SAKAI; SHIMOMURA, 1995), a quebra dos cotilédones (PENICE, 1991; STANWOOD, 1985; PRITCHARD; MANGER; PRENDERGAST, 1988) e lesão interna da semente por congelamento (VERTUCCI, 1989).

A criopreservação de embriões zigóticos é uma alternativa, uma vez que algumas sementes são grandes o que pode aumentar consideravelmente

o volume do material a ser criopreservado, além disso, o tegumento das sementes pode conter compostos fenólicos que atuam como inibidores da germinação (SILVA et.al, 2011).

O armazenamento de sementes de espécies do Cerrado, como *H. serratifolius*, é importante para a conservação de germoplasma de populações e para a produção de mudas em diferentes épocas do ano (SILVA et al., 2011).

2.4.2 Criopreservação de ápices caulinares

Técnicas de criopreservação são aplicáveis a diferentes tipos de tecido com potencial de regeneração e as técnicas mais recentes utilizam ápices caulinares para a formação de criobancos (REED, 2008; PANIS, 2009).

Para a criopreservação de ápices caulinares, a técnica mais utilizada é a “*droplet vitrification*” em que os ápices são pré-tratados em meios com diferentes concentrações de sacarose e, após esse pré-cultivo, são tratados em uma solução chamada de carregamento que é composta por 2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), antes da imersão em solução PVS2 a 0 °C, por diferentes períodos. Em seguida, os ápices são então colocados em uma folha de papel alumínio com uma gota da solução de PVS2 e rapidamente imersas em nitrogênio líquido para o congelamento. O descongelamento é realizado à temperatura ambiente e emprega-se uma solução de diluição rica em sacarose. Após o descongelamento, os ápices são colocados em meio específico de regeneração previamente estabelecido e a retomada do crescimento é avaliada após algumas semanas de cultivo. (ENGELMANN, 2011; CHEN et al., 2011).

De acordo com BENSON; HARDING; JOHNSTON (2007), para que a criopreservação de ápices caulinares seja considerada satisfatória, os explantes devem apresentar, no mínimo, 50% de sobrevivência.

São poucos os trabalhos relacionados com a criopreservação de *H. serratifolius*, deste modo, há uma necessidade de estudos deste tipo de preservação para a espécie visando a conservação de germoplasma.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. F. et al. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. **Acta Botanica Brasílica**, Feira de Santana, v.27, n. 4, p. 714-722, Oct./Dec. 2013.
- BASTOS, L. P. et al. Cultivo *in vitro* de magabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p. 1122-1124, jul. 2007.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvalis: Springer, 2008. p. 15-32.
- BENSON, E. E.; HARDING, K.; JOHNSTON, J. W. Cryopreservation of shoot tips and meristems. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 368, p. 163-183, Mar. 2007.
- CENTRO NACIONAL RECURSOS GENÉTICOS - CENARGEN, Embrapa Brasil. Disponível em < <http://www.cenargen.embrapa.br>>. Acesso em: 24 dez. 2013.
- CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, p. 397-403, Apr. 2011.
- DOUSSEAU, S. et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, nov./dez., 2008.
- ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, v.112, p. 9-18, 1997.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm- a review. **Euphytica**, Dordrecht, v.57, p. 227-243, Sept. 1991.

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

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro & Developmental Biology*, Columbia v. 47, p. 5-16, Nov. 2011.

EVANGELISTA JUNIOR, C. G. et al. Hepatotoxicidade de plantas medicinais. LIII. Ação da infusão de *Tabebuia avellanedae* Lor. ex griseb. no rato. *Revista Científica da Universidade de Franca*, Franca, v.6, n.1, p.13-16, jan/abr. 2006.

FERNANDES, P. et al. Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiology*, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1841-1850, Aug. 2008.

FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo: *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. *Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia*, Manaus, v. 5, 2004.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae - Part. II. (Tribe Tecomae). *Flora Neotropica Monograph*, New York, v. 25, n.2, p. 1-370, 1992.

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

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.92, p. 1-13, Jan. 2008.

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-CNPq, 1998. p. 183-260.

GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, Laramie, v.32, n. 3, p. 660–670, Jul./Sept. 2007.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120, Jan. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção agrícola municipal**: culturas temporária e permanentes. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 24 dez. 2013.

ISHIKAWA, K. et al. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 11, p. 754-757, Feb. 1997.

ISHIKAWA, M. et al. Effect of growth phase on survival of Bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. **Annals of Botany**, Oxford, v.97, p.453-459, Mar. 2006.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 6, p. 778-800, June 2011.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 1, 351p.

MENGES, M.; MURRAY, J. A. H. Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabidopsis* and tobacco cell suspension cultures. **The plant Journal**, London, v.37, n. 4, p.635-644, Febr. 2004.

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

MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. **Annals of Botany**, Oxford, v.75, n.4, p.331-336, Apr. 1995.

OLIVEIRA, L. M. et al. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley - (Bignoniaceae) pelo teste de raio X. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 2, p. 138-143, dez. 2004.

OLIVEIRA, L. M. et al. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. – Bignoniaceae. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 642-648, maio/jun. 2005.

PANIS, B. **Cryopreservation of musa germplasm**. 2nd ed. Montpellier: Bioversity International, 2009. 48 p. (INIBAP Technical Guideline, 9).

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. **The Role of Biotechnology**, Turin, v. 5, n. 7, p. 43-54, Mar. 2005.

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

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

PENCE, V. C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. **Seed Science and Technology**, v. 19, n.2, p. 235–251, 1991.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

POPOVA, E.; KIM, H. H.; PAEK, K. Y. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 522-528, May 2010.

PRITCHARD, H. W.; Classification of seed storage 'types' for *ex situ* conservation in relation to temperature and moisture. In: GUERRANT, E. O.; HAVENS, K.; MAUNDER M. *Ex situ* plant conservation: supporting species survival in the wild. Washington: Island Press, 2004. p. 139–161.

PRITCHARD, H. W.; MANGER, K. R.; PRENDERGAST, F. G. Changes in *Trifolium arvense* seed quality following alternating temperature treatment using liquid nitrogen. **Annals of Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 1–11, Jul. 1988.

REED, B. M. *Plant Cryopreservation: A Practical guide*. New York: Springer, 2008. . 515 p.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

RODRIGUES, C. M. et al. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). **Flora**, Jena, v.207, n.4, p. 264-274, Apr. 2012.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, New York, v. 32, p. 741–757, Jun. 2013.

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

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, New York, v. 9, n.1, p. 30-33, June 1990.

SALUSTIANO, E. S. J. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alphalapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational New Drugs**, Dordrecht, v.28, p. 139-44, Apr. 2010.

SANTOS, F. S. et al. Biometria e qualidade fisiológica de sementes de diferentes matrizes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A. DC.) Standl. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 82, p. 163-173, jun. 2009.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: a alternativa para conservação a longo prazo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.20, p.60-65, maio./jun. 2001.

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, jul. 2000. Especial.

SARKAR, D.; NAIK, P. S. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification. **Annals of Botany**, Oxford, v.82, p.455-461, Apr./May 1998.

SHIBATA, T.; SAKAI, E.; SHIMOMURA, K. Effect of rapid freezing and thawing on hard-seed breaking in *Astragalus mon-gholicus* Bunge (Leguminosae), **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.147, n.1, p. 127-131, Oct. 1995.

SILVA, D. G. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia*. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2011

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31. n.4, p.1048-1053, July/Aug. 2007.

SOUZA, V. C. et al. Vigor de sementes armazenadas de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.29, n.6, p.833-841, nov./dez. 2005.

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

STEINMACHER, D. A. et al. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. **CryoLetters**, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 13-22, Jan./Feb. 2007

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

TORRES, A. C, CALDAS L. S.; BUZZO J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1., 864p.

UCHENDU, E. E. et al. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 1, p. 25-35, Jan. 2010.

VERTUCCI, C. W. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. **Plant Physiology**, Rockville, v.90, n.4, p.1478-1485, Aug. 1989.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, San Diego, v.52, n.1, p.48-61, Feb. 2006

WALTERS, C.; WHEELER, L.; STANWOOD, P. C. Longevity of cryogenically stored seeds, **Cryobiology**, San Diego, v. 48, n. 3, p. 229–244, Jun. 2004

WEN, B.; WANG, R. Pre-treatment incubation for culture and cryopreservation of Sabal embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 237-243, Aug. 2010.

CAPITULO 2

**ORGANOGENESE *in vitro* EM *Handroanthus serratifolius* (Vahl). S. O.
Grose**

RESUMO

Handroanthus serratifolius, conhecida como ipê-amarelo, é uma espécie arbórea com potencial ornamental, medicinal e madeireiro. A organogênese é uma via de regeneração na qual órgãos vegetais são induzidos de forma adventícia. O objetivo deste trabalho foi estudar as diferentes etapas do cultivo *in vitro* de *H. serratifolius*. Para a germinação *in vitro*, sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), o tegumento foi removido e os embriões desinfestados em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por diferentes tempos e em seguida inoculados em meio MS com 1,44 μM de GA₃. A porcentagem de germinação, contaminação, comprimento da parte aérea e número de raízes foram avaliados. Para o enraizamento, plântulas germinadas *in vitro* foram seccionadas e a parte aérea inoculada em meio WPM com diferentes concentrações de AIB, a porcentagem de enraizamento, o número de raízes e o comprimento da maior raiz foram avaliados e as plantas aclimatizadas. Ao final da aclimatização, a sobrevivência, a porcentagem de crescimento e a porcentagem do número de novas folhas foram avaliadas. Para a regeneração de brotos a partir de raízes, segmentos radiculares foram inoculados em meio WPM suplementado com diferentes concentrações AIA e a formação e o número de brotos foram avaliados. Para a indução de brotações *in vitro*, segmentos nodais foram inoculados em meio WPM acrescido de diferentes concentrações de BAP e a porcentagem de formação de calos, o número de brotos, o comprimento da parte aérea e o número de folhas foram avaliados. Para o enraizamento *in vitro*, as brotações adventícias foram inoculadas em meio WPM contendo diferentes concentrações de AIB e o número de raízes, a formação de calos, o crescimento da brotação e a emissão de novas folhas foram avaliados. Para o crescimento *in vitro* de ápices caulinares (1 mm²), foi avaliada a influência do meio WPM com diferentes concentrações de BAP antes da transferência para meio WPM contendo 0,25 μM BAP e ANA. Foram avaliados a formação de calos na base dos ápices, o comprimento da parte aérea e o número de folhas das brotações. Foi observado que o uso de hipoclorito de sódio (1%) é eficaz na descontaminação dos embriões de *H. serratifolius* no tempo de um minuto. Ocorreu indução de raízes independentemente das concentrações de AIB testadas. A aclimatização foi eficiente com 100% das plantas. A maior formação de brotos a partir de raízes foi observada nas concentrações de 1 e 5 μM de AIA. O uso de 2 μM de BAP promoveu melhores respostas para a indução de brotações e para o cultivo *in vitro* de ápices caulinares. Não houve diferenças estatísticas para os parâmetros testados para o enraizamento das brotações adventícias.

Palavras-chave: Micropropagação. Ipê amarelo. Cultivo *in vitro*. Regeneração.

ABSTRACT

Handroanthus serratifolius, known as yellow ipe, is a tree species with ornamental, medicinal and lumberjack potential. Organogenesis is a means of plant regeneration which organs are induced to form in an adventitious way. The aim of this work was to study the different stages of *in vitro* culture of *H. serratifolius*. For *in vitro* germination seeds were decontaminated in sodium hypochlorite (2% active chlorine), the seed coat was removed and the embryos decontaminated with sodium hypochlorite (1% active chlorine) for different times and then inoculated on MS medium with 1.44 mM of GA₃. The percentage of germination, contamination, shoot length and number of roots were evaluated. For rooting, *in vitro* germinated seedlings were sectioned and shoots inoculated in WPM medium with different IBA concentrations, the rooting percentage, number of roots, length of roots were evaluated and the plants were acclimatized. At the end of acclimatization, survival, growth percentage and the percentage of the number of new leaves were evaluated. For regeneration of shoots from roots, root segments were inoculated in WPM medium supplemented with different IAA concentrations and induction and number of shoots were evaluated. For shoot induction, *in vitro* nodal segments were inoculated in WPM medium supplemented with different BAP concentrations and the percentage of callus formation, number of shoots, shoot length and number of leaves were evaluated. For *in vitro* rooting, the adventitious shoots were inoculated in WPM medium containing different IBA concentrations and the number of roots, callus formation, growth and sprouting of new leaves were evaluated. For the *in vitro* growth of shoot tips (1 mm²), the influence of WPM medium with different BAP concentrations before transfer to WPM medium containing 0.25 μM BAP and NAA was evaluated. Callus formation at the base of the shoot tips, the shoot length and number of leaves of the shoots were evaluated. It was observed that the use of sodium hypochlorite (1%) is effective in decontaminating *H. serratifolius* embryos at a time of one minute. Root induction occurred regardless of IBA concentrations. Acclimatization was efficient with 100% of acclimatized plants. The increased formation of shoots from roots was observed at concentrations of 1 and 5 μM IAA. The use of 2 μM BAP promoted best results for shoot induction and *in vitro* culture of shoot tips. There were no statistical differences in the parameters tested for rooting of adventitious shoots.

Keywords: Micropropagation. Yellow ipe. *In vitro* culture. Regeneration.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *H. serratifolius* conhecida como ipê-amarelo, pertence à família Bignoniaceae e possui interesse econômico madeireiro, ornamental e medicinal. Na indústria farmacêutica, extratos vegetais desta espécie são utilizados no tratamento de uma variedade de patologias, incluindo doenças relacionadas com o câncer (SALUSTIANO et al., 2010). Nesse sentido é interessante o desenvolvimento de protocolos de micropropagação para a espécie.

O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido uma das contribuições mais significativas para o avanço do processo de propagação de espécies nativas e plantas lenhosas, principalmente devido ao tamanho reduzido do explante e a rápida proliferação de gemas axilares (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013; SOARES et al., 2007). A micropropagação é a técnica mais utilizada com a finalidade de obtenção de um grande número de plantas uniformes independente da época do ano, além disso, as vias de regeneração podem ser obtidas por organogênese ou embriogênese somática (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

A organogênese *in vitro* ocorre com a formação de gemas adventícias, que se originam em locais diferentes daqueles que ocorrem no curso normal de desenvolvimento vegetal. Os fito-hormônios e os fitorreguladores se destacam como os principais controladores dos processos morfogênicos, e um aspecto importante na multiplicação *in vitro* está relacionado com o tipo de citocinina e sua concentração, sendo estes determinantes no sucesso da multiplicação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A organogênese pode ocorrer de forma direta ou indireta. A direta ocorre a partir do tecido do explante e a indireta é

precedida pelo desenvolvimento de calos (TORRES; CALDAS; BUSO, 1999).

Auxinas e citocininas podem ter efeitos antagônicos ou complementares, de acordo com a etapa de desenvolvimento da plântula e das concentrações empregadas (KLERK, 2002; BIELACH et al., 2012). As auxinas, sendo um forte sinal à dominância apical, mantêm a dormência de gemas laterais, funcionando em sentido oposto às citocininas (MULLER; LEYSER, 2011). Entretanto, a formação de raízes adventícias, induzida muitas vezes pela adição de auxina, pode promover o crescimento dos brotos, já que são as raízes as principais fontes de citocinina (MULLER; LEYSER, 2011). As citocininas, por sua vez, são capazes de inibir o enraizamento porém com o alongamento dos brotos aumenta a capacidade de enraizamento (DE KLERK, 2002).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar etapas do cultivo *in vitro* de *H. serratifolius*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Sementes de ipê amarelo foram coletadas após a dispersão no *Campus* universitário da Universidade Federal de Lavras no município de Lavras - MG, Brasil localizado a 21° 14 '43 S, 44° 59' 59 W.

2.2 Germinação *in vitro* e teste de desinfestação dos embriões

Sementes de ipê amarelo foram lavadas em água corrente durante 30 minutos, no início da lavagem foram adicionadas 5 gotas do detergente Twin 20. Após esse período, as sementes foram levadas à câmara de fluxo laminar onde foram desinfestadas com a imersão em álcool 70%, por 30 segundos seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), durante 10 minutos. Ao final deste tempo, foi feita a tríplex lavagem com água destilada e autoclavada e, posteriormente o tegumento foi retirado com auxílio de pinças de ponta fina.

A seguir os embriões foram imersos em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) pelos seguintes tempos: 0, 1, 2, 4 e 8 minutos. Ao final destes, os embriões foram lavados por três vezes em água destilada e autoclavada e em seguida inoculados em tubo de ensaio contendo o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1,44 μ M de GA₃ (ácido giberélico), 0,09 M de sacarose, 7 g L⁻¹ ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos (ABBADÉ; PAIVA; PAIVA et al., 2010). Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de

crescimento na temperatura de 25 ± 2 °C, sob irradiância de $36 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e com fotoperíodo de 16 horas.

Após 15 dias de cultivo, foram feitas avaliações para os seguintes parâmetros: porcentagem de germinação (protrusão da radícula) e de contaminação, comprimento da parte aérea e número de raízes. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, cada repetição constituindo de quatro tubos contendo um embrião cada. Utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANAVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

2.3 Enraizamento de brotações germinadas *in vitro*

Segmentos caulinares contendo a gema apical com aproximadamente 5 cm de comprimento, oriundas da germinação *in vitro*, foram utilizadas para o enraizamento.

As brotações foram inoculadas em meio de indução de enraizamento constituído dos sais do meio Wood Plant Medium (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980) adicionado de diferentes concentrações (0, 1, 5, 10 e 20 μM) da auxina AIB (ácido indolbutírico). O meio foi suplementado com 0,09 M de sacarose, geleificado com 7 g L^{-1} de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

As brotações permaneceram por cinco dias no escuro em meio de indução de enraizamento antes da transferência para o meio WPM, com ausência de auxina e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. Os explantes foram então transferidos e mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias, foram analisadas as seguintes variáveis: formação de raízes, número de raízes, comprimento médio das raízes. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de quatro tubos com um explante cada. Utilizando-se o *software* SISVAR

(FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANAVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

2.4 Aclimatização

Plantas oriundas do experimento de enraizamento 2.3 foram utilizadas como fonte de explante para aclimatização em tubetes (290 cm³), contendo o substrato comercial Multiplant®. Após a transferência das plantas para o substrato, foi realizada uma rega com água destilada e os tubetes foram cobertos com sacos plásticos para evitar a perda excessiva de água por parte dos explantes. A cada sete dias, uma das extremidades dos sacos plásticos era cortada e, ao fim de 21 dias, esses foram retirados.

As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura média de $28^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Decorridos 28 dias, foram avaliadas a sobrevivência das plantas, a porcentagem de crescimento e de formação de novas folhas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento (concentrações de auxina no experimento de enraizamento) sendo cada repetição composta por quatro tubetes com uma planta cada. Utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANAVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

2.5 Regeneração *in vitro* de brotos a partir de organogênese direta

Após 15 dias de germinação *in vitro*, raízes de plântulas foram utilizadas como fonte de explantes para a indução de brotações.

Segmentos foram excisados abaixo do cotilédone e dois tipos de explantes foram utilizados: segmento um (S1): os primeiros 1,5 cm abaixo do cotilédone e segmento dois (S2): 1,5 cm abaixo de S1.

Os segmentos radiculares foram inoculados em tubo de ensaio contendo o meio de cultura WPM suplementado com AIA (ácido indolacético) após a autoclavagem nas concentrações (1, 5 e 10 μM), além do tratamento controle (ausência de auxina). O meio foi suplementado com 0,09 M de sacarose, 7 g L^{-1} de ágar e o pH ajustado em 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos (tipo de explante x AIA), cada tratamento era composto por cinco repetições, sendo cada repetição contendo quatro tubos com um explante cada.

Após 30 dias, foi avaliado a porcentagem de brotação e o número de brotos por explante. Utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANAVA e comparados pelo teste de Tukey.

2.6 Indução de brotações *in vitro* a partir de segmentos caulinares

Plântulas oriundas da germinação *in vitro*, foram utilizadas como fonte de explantes.

Segmentos nodais com aproximadamente 2 cm de comprimento e contendo duas gemas laterais foram inoculados na posição vertical em meio WPM, suplementado com 0,09 M de sacarose e diferentes concentrações (0, 2, 4 e 8 μM) da citocinina BAP (6-benzilaminopurina). O meio foi gelificado com 7 g L^{-1} de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e com fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias de cultivo, foram analisados a porcentagem de calos, o número de brotos, o comprimento da parte aérea do maior broto e o número total de folhas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado

com seis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituído de cinco tubos de ensaio com um segmento nodal por tubo. Com o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANAVA e comparados pelo teste de Tukey.

2.7 Enraizamento *in vitro* das brotações

Brotações oriundas do experimento 2.6 foram individualizadas, o comprimento inicial foi obtido e os explantes cada um contendo o ápice caulinar e um par de gemas laterais foram transferidos para meio WPM com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, suplementado com $0,09 \text{ M}$ de sacarose e solidificado com 7 g L^{-1} de ágar onde permaneceram 30 dias para a eliminação do efeito residual dos reguladores de crescimento. Após esse período, as brotações foram inoculadas em meio de cultura WPM com diferentes concentrações da auxina AIB (0; 0,1; 1; $10 \text{ }\mu\text{M}$) suplementado com $0,09 \text{ M}$ de sacarose, gelificado com 7 g L^{-1} de ágar e pH ajustado para 5.8 antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos no escuro por cinco dias antes da transferência para meio livre de auxina e com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. As brotações foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, sob irradiância de $36 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e com fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias de cultivo, foram avaliados os seguintes parâmetros: número de raízes, tamanho das raízes, calogênese, crescimento da brotação e emissão de novas folhas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de quatro tubos de ensaio com uma brotação por tubo. Com o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANAVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

2.8 Crescimento *in vitro* de ápices caulinares

Plântulas oriundas da germinação *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes.

Ápices caulinares com diâmetro de aproximadamente 1 mm foram excisados e inoculados em placa de Petri (9,2 cm de diâmetro) contendo meio WPM, 0,25 μM ANA (ácido naftaleno acético) suplementado com 0,09 M de sacarose, com 10 ppm de ácido ascórbico, gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações (0, 2, 4 e 8 μM) de BAP.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro por 14 dias antes da transferência para sala de crescimento a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 horas. Após 28 dias de cultivo em placas, os ápices foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio WPM com as mesmas concentrações de BAP (0, 2, 4 e 8 μM) e 0,25 μM de ANA.

Para evitar a formação excessiva de calos na base dos ápices em crescimento, após 15 dias de cultivo em tubos de ensaio, os ápices foram transferidos para meio WPM, contendo 0,25 μM BAP e 0,25 μM de ANA. Decorridos 40 dias de cultivo em meio com BAP e ANA, foram avaliados a formação de calos na base do explante, o comprimento da parte aérea (cm) e o número de folhas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 30 repetições por tratamento, em que cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio contendo um ápice caulinar cada. Utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011), os dados foram submetidos à ANOVA e comparados pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de desinfestação dos embriões

Não houve diferenças significativas para porcentagem ($p>0,05$) com relação aos diferentes tempos de exposição dos embriões em hipoclorito de sódio, com uma média geral de 93% de embriões germinados, 3,12 cm de altura da plântulas e 3,5 raízes por planta.

Já para a porcentagem de contaminação foram observadas diferenças significativas. Entretanto, o tratamento com ausência de hipoclorito de sódio (controle) apresentou 30% de embriões contaminados ($p<0,05$). Com relação aos diferentes tempos de exposição ao hipoclorito de sódio, não foram observadas diferenças significativas (Figura 1).

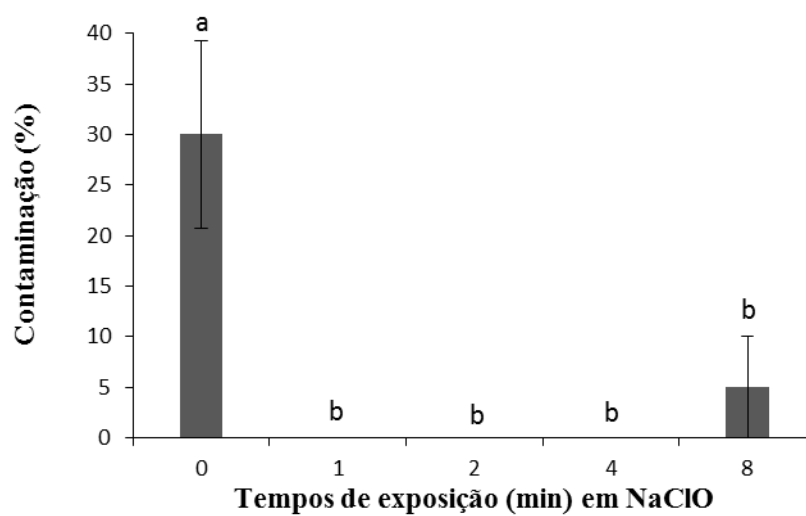


Figura 1 Porcentagem de contaminação de embriões de *Handroanthus serratifolius* tratados com hipoclorito de sódio em diferentes tempos de exposição. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada tempo (min) não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

George; Hall e Klerk (2008) afirmam que o tempo de exposição e a concentração dos agentes desinfetantes dependem do tipo de explante utilizado, que pode apresentar respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente deve eliminar os microrganismos e não causar danos ou morte aos tecidos.

Foi observado neste estudo, que a desinfestação dos embriões com hipoclorito de sódio 1% foi eficiente no controle da contaminação, especialmente nos tempos de um a quatro minutos, uma vez que a ausência do tratamento com hipoclorito de sódio 1% promoveu 30% de contaminação ($p < 0,05$). Independentemente do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio utilizado na desinfestação dos embriões, não foi observada a ação fitotóxica nos tecidos com média geral de 93% de germinação.

Os resultados obtidos neste trabalho também diferem dos publicados por Nery et al. (2008), em que tais autores estudando a germinação *ex vitro* de *Tabebuia serratifolia*, (ipê-amarelo) mencionam que o tratamento de desinfestação dos embriões com hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos acarretou em redução na porcentagem de germinação.

3.2 Enraizamento *in vitro* de plântulas

Independentemente da concentração de AIB utilizada, houve a formação de raízes em todas as brotações de ipê amarelo cultivadas *in vitro* (Figura 2). Não houve diferenças significativas para a formação de raízes com 92% de brotações enraizadas nem para o número de raízes com uma média geral de 1,4 por explante ($p > 0,05$).



Figura 2 Planta de *H. serratifolius* enraizada após 30 dias de cultivo.

Em relação ao comprimento médio de raízes, diferenças significativas foram observadas ($p < 0,05$) com uma média geral de 6,9 cm sendo o tratamento que continha 20 μM de AIB aquele que proporcionou o maior comprimento médio (11,6 cm) entre os tratamentos (Figura 3).

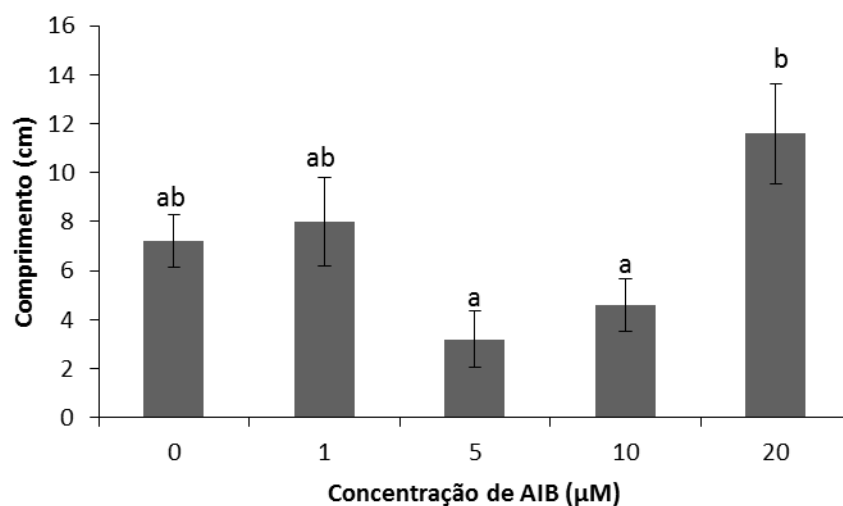


Figura 3 Comprimento médio de raízes de plântulas de *Handroanthus serratifolius* após tratamento com diferentes concentrações de AIB aos 30 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Auxinas têm reconhecidamente, efeito positivo no início da formação de raízes por estimular a diferenciação celular e o acúmulo de auxinas endógenas ou exógenas induz à formação de raízes (SOARES et al., 2007; LASKOWSKI et al., 2008).

Provavelmente para a espécie em estudo o balanço hormonal endógeno seja suficiente, quando comparados com concentrações de até 10 μM de AIB. Acima dessa concentração, há o efeito da auxina exógena.

Resultados similares aos obtidos no atual estudo foram observados por Campos et al. (2013), em que plântulas de umburana de cheiro apresentaram média de 92% de enraizamento quando 10 μM de AIB foi adicionado ao meio de cultura. Cardoso e Silva (2013), utilizando diferentes concentrações de AIB no enraizamento de *Zeyheria Montana* Mart. (Bignoniaceae), também observaram alta taxa de enraizamento das brotações (65%) em meio de cultura contendo 7,3 μM de AIB.

Soares et al. (2007); Santana et al. (2008); Cardoso e Silva (2013) também destacam os efeitos positivos da auxina AIB na melhoria do enraizamento de plântulas *in vitro*.

3.3 Aclimatização

Na fase de aclimatização, não foram observadas diferenças significativas para as variáveis analisadas. Independentemente da concentração de auxina AIB empregada na fase de enraizamento, houve 100% de sobrevivência (Figura 4). A média geral da porcentagem de crescimento e da porcentagem do número de novas folhas foi de 59% e 37% respectivamente.

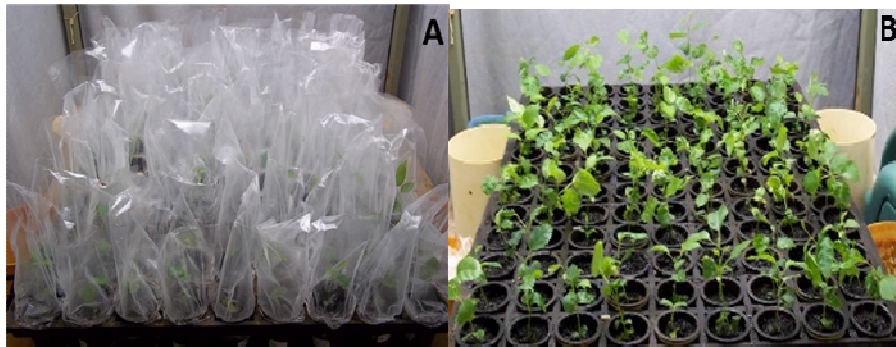


Figura 4 Plantas aclimatizadas em sala de crescimento (A), sobrevivência das plantas após 28 dias de aclimatização (B).

Cardoso e Silva (2013), estudando *Zeyheria Montana* Mart. (Bignoniaceae), obtiveram 100% de sobrevivência das plântulas, na fase de aclimatização, utilizando brotações oriundas do enraizamento *in vitro* tratadas com diferentes concentrações (2,8; 5,7; 8,5 e 11,4 μM) de AIB.

3.4 Regeneração *in vitro* de brotos a partir de organogênese direta

Neste experimento, pôde-se observar o surgimento de brotos em alguns dos tratamentos testados. Não houve diferenças estatísticas com relação aos segmentos (S1 e S2), porém diferenças estatísticas foram encontradas para as concentrações de AIA ($p < 0,05$) com uma média geral de 21% dos segmentos apresentando brotações. O tratamento com 1 μM de AIA proporcionou a maior porcentagem observada de brotações 32,5%. (Figura 5).

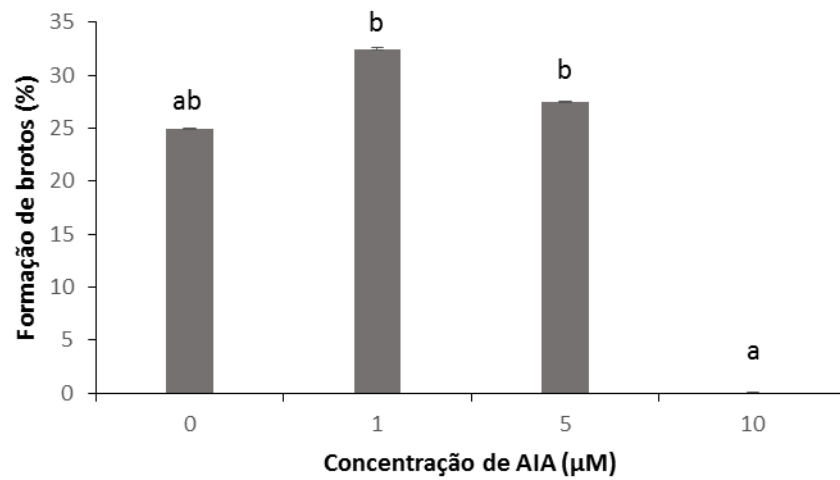


Figura 5 Porcentagem da formação de brotos em segmentos radiculares de ipê amarelo em diferentes concentrações de AIA. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Mesmo na ausência do regulador, foi observada formação de brotos indicando que, provavelmente, o nível endógeno de hormônios foi suficiente para assegurar esta resposta (Figura 6).

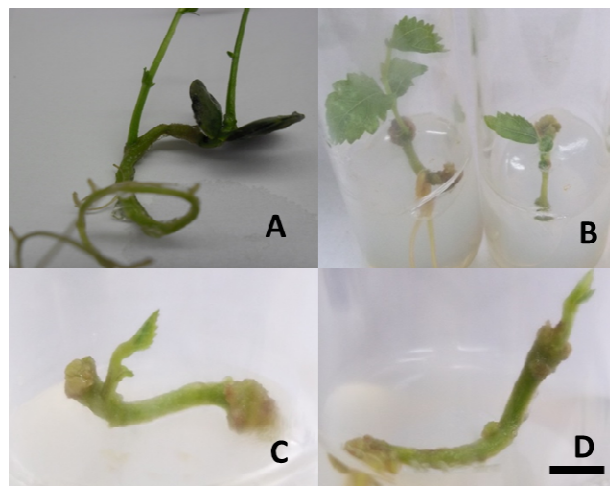


Figura 6 Aspecto visual da germinação e das brotações originadas das raízes em *Handroanthus serratifolius*. (A) Plântula oriunda da germinação *in vitro*; (B) brotações regeneradas no tratamento controle, (C) brotação oriunda do tratamento 5 µM AIA, (D) brotação oriunda do tratamento 1 µM AIA. Barra = 10 mm.

Com relação ao número de brotos por explante, pode-se observar diferenças significativas ($p < 0,05$) com média geral de 0,2 brotos. As maiores médias observadas foram quando o AIA foi adicionado ao meio nas concentrações de 1 e 5 μM promovendo a formação de 0,32 brotos por explante, sendo que, de acordo com a derivada da equação, a estimativa seria de 0,34 brotos com a adição de 3,1 μM de AIA ao meio de cultura (Figura 7).

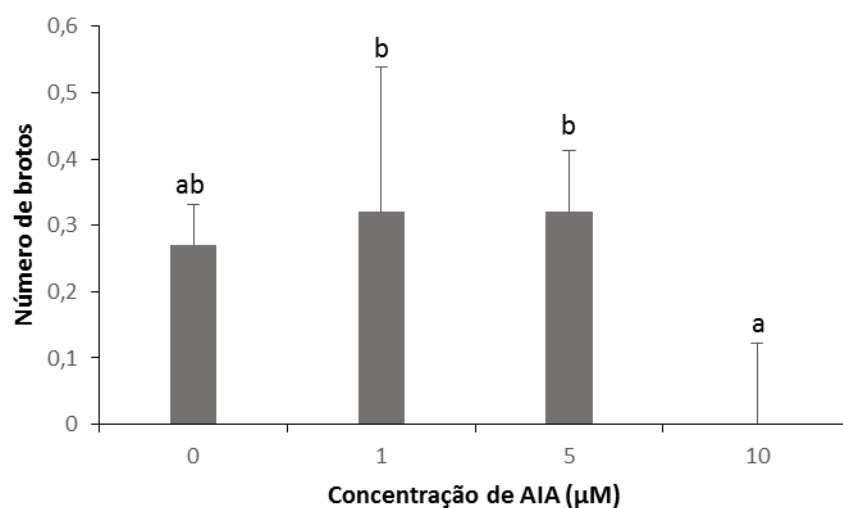


Figura 7 Média do número de brotos em segmentos radiculares de ipê-amarelo em diferentes concentrações de AIA. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

O potencial para a regeneração de plantas a partir de raízes para *Handroanthus serratifolius* não foi bem elucidado, portanto há a necessidade de novos estudos, já que, neste trabalho, foi observado que a espécie tem potencial para este tipo de regeneração. Protocolos de regeneração de plantas a partir de raízes tem sido relatados para outras espécies, tais como, *Brassica oleracea* var *italica* (YANG et al., 2010), *Tylophora indica* (SAHAI; SHAHZAD; SHARMA, 2010), *Passiflora* spp. (SILVA et al., 2011; ROCHA et al., 2012), *Cassia angustifolia* (PARVEEN; SHAHZAD, 2011),

Centaurea ulreiae (MALLON et al., 2011) e *Bixa orellana* L. (CRUZ et al., 2013).

3.5 Indução de brotações *in vitro*

O efeito do BAP, com relação ao número de brotos, não foi significativo ($p>0,05$) com média geral de um broto por explante. De acordo com os resultados observados neste trabalho, o efeito das diferentes concentrações de BAP utilizadas, não foi suficiente para promover uma resposta significativa para a indução de novas brotações.

Martins et al. (2009) trabalhando com segmentos nodais *Tabebuia impetiginosa* visando a indução de brotações, observaram que na concentração de 4,4 μM de BAP foi obtido uma média de 4 brotações por explante e mesmo na ausência deste regulador foi observado a formação de brotos.

Entretanto na presença de 2 μM de BAP, observou-se brotações com comprimento médio de 17,8 mm, superior àquele observado em brotações inoculadas em meio na ausência de BAP ($p<0,05$) (Figura 8). Acima desta concentração, houve uma tendência de redução no comprimento dos brotos formados.

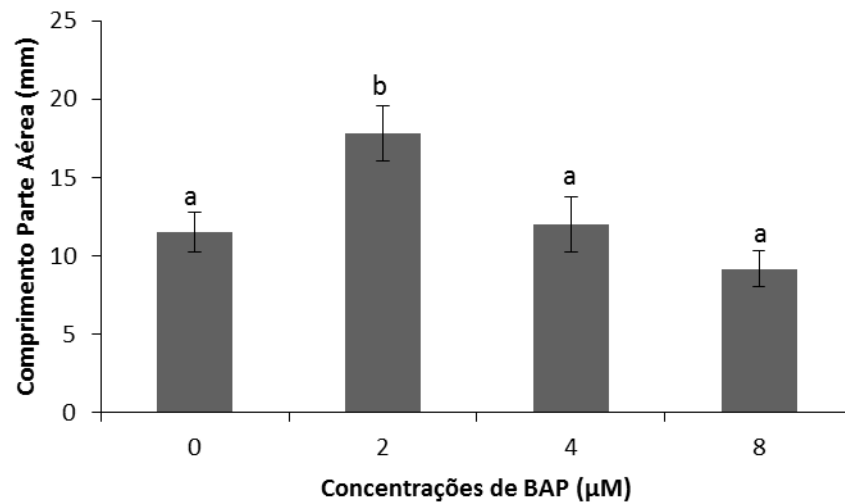


Figura 8 Comprimento das brotações de *Handroanthus serratifolius* em diferentes concentrações de BAP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados semelhantes foram encontrados por Soares et al. (2007) ao induzirem brotações em segmentos caulinares de *Hancornia speciosa* no qual os autores observaram que o aumento das concentrações de BAP inibia o alongamento das brotações.

A tendência de inibição do comprimento de brotações a partir de determinada concentração de citocinina pode decorrer de um possível efeito fitotóxico da adição do regulador de crescimento ao meio de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para a porcentagem de calos formados na base do explante, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), sendo que o tratamento controle (ausência do regulador BAP) apresentou 26% de formação de calos e o uso de 2 e 4 µM de BAP promoveram a maior formação de calos (100%) nas brotações. Com o aumento da concentração para 8 µM foi observado um decréscimo de 10% na calogênese (Figura 9).

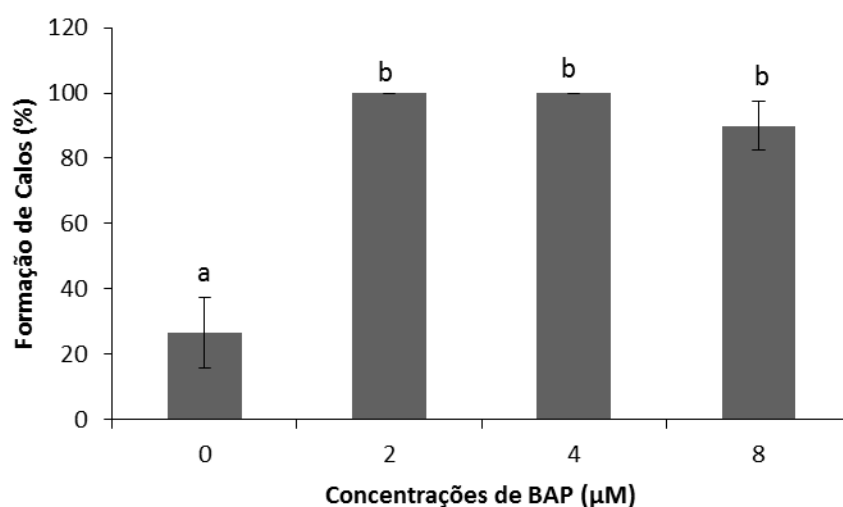


Figura 9 Porcentagem da formação de calos em segmentos caulinares de *Handroanthus serratifolius* em diferentes concentrações de BAP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Martins et al. (2009) estudando a multiplicação *in vitro* de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*) observaram a ocorrência de calos na base dos explantes nos tratamentos que empregaram concentrações superiores a 4,4 µM de BAP, sendo que o tratamento contendo 35 µM foi o que obteve a maior presença de calos (66,6%). Já no presente estudo, mesmo na ausência do regulador de crescimento, foi observada a formação de calos indicando que provavelmente o nível endógeno de citocinina e auxina foram suficientes para ocasionar esta resposta.

Semelhante ao atual trabalho, Soares et al. (2007) observaram que a ocorrência de calos na base dos segmentos caulinares de *Hancornia speciosa* cultivadas *in vitro* aumentaram (até 90%) com o acréscimo de BAP ao meio de cultura, até a concentração de 17,7 µM. A partir deste ponto, uma tendência de queda dessa variável resposta foi verificada.

Em relação ao número de folhas, observou-se que na ausência de BAP no meio de cultura houve a formação de brotações com maior número

de folhas e que o aumento da concentração de BAP relacionou-se diretamente a uma queda no número de folhas ($p < 0,05$) (Figura 10).

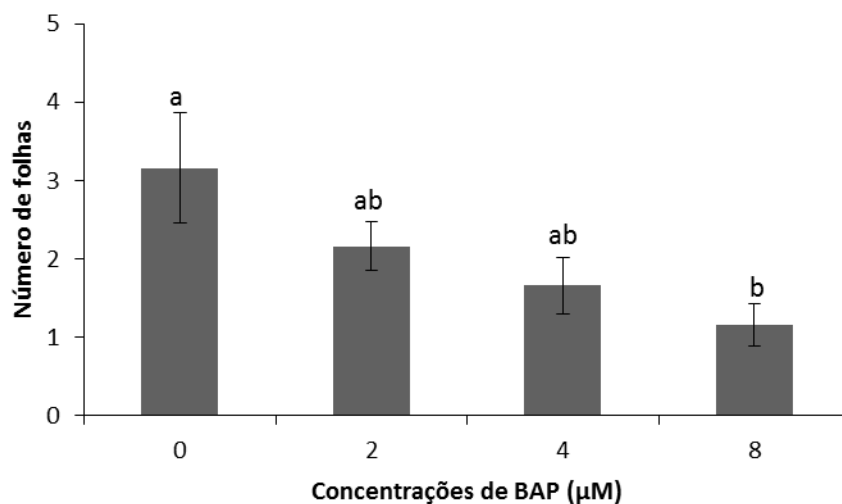


Figura 10 Número de folhas por brotações de *Handroanthus serratifolius* em diferentes concentrações de BAP. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com Preece (1995), as citocininas são primordiais na divisão celular, atuam na quebra da dominância apical, na indução e no crescimento de brotações. Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que o tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

3.6 Enraizamento *in vitro* das brotações

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para nenhum dos parâmetros testados, sendo que a média geral para número de raízes foi 1, o tamanho médio total das raízes foi de 4,5 cm, a formação de calos na base dos explantes foi de 48%, a porcentagem de crescimento da brotação foi de 40%, e o número de folhas novas foi de 1,5. Embora sem diferenças estatísticas, pôde-se observar que numericamente, a concentração

de 0,1 μM de AIB, proporcionou as maiores médias para todos os parâmetros analisados, indicando que concentrações baixas desse regulador entre 0,1 e 1 devem ser investigadas.

3.7 Crescimento *in vitro* de ápices caulinares

Foram observadas diferenças significativas para a formação de calos ($p < 0,05$) na base dos explantes com uma média geral de 79%. Na ausência do regulador de crescimento BAP, não foi observada formação de calos (Figuras 11 e 12). A maior porcentagem de formação de calos, 100%, foi observada quando da utilização de 4 e 8 μM de BAP (Figura 11). Aspecto visual da formação de calos nos ápices caulinares cultivados no escuro e no claro, bem como das plântulas obtidas a partir dos ápices pode ser observado na Figura 12.

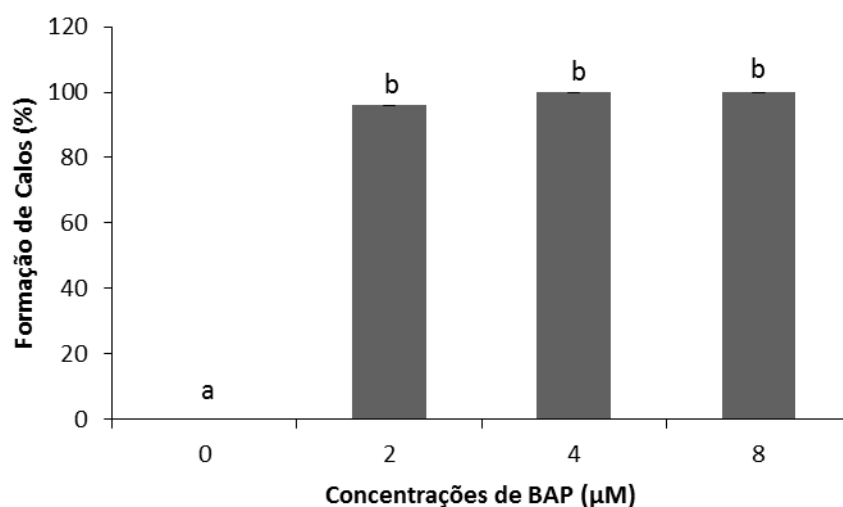


Figura 11 Formação de calos em ápices caulinares de *Handroanthus serratifolius* em diferentes concentrações de BAP aos 40 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

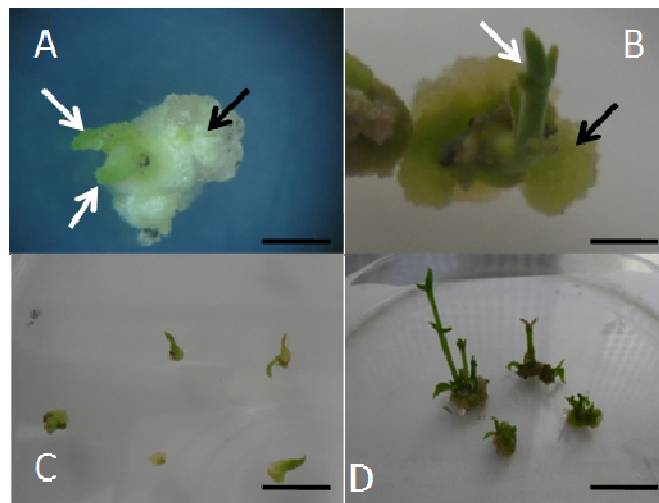


Figura 12 Aspectos dos ápices caulinares de *Handroanthus serratifolius* cultivados *in vitro*. (A) ápices com 14 dias mantidos no escuro. (B) Cultivo dos ápices aos 30 dias na luz. (C) Tratamento controle aos 30 dias de cultivo. (D) brotações originadas dos ápices caulinares após 40 dias de cultivo. Barras = 5 mm. Setas brancas: primórdios foliares. Setas pretas: calos.

Para o número de folhas, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas diferentes concentrações de BAP utilizadas. Na concentração de 2 μM foi observada a formação de duas folhas por brotação (Figura 13). Ausência de BAP no meio de cultura não ocasionou a formação de folhas nos ápices caulinares.

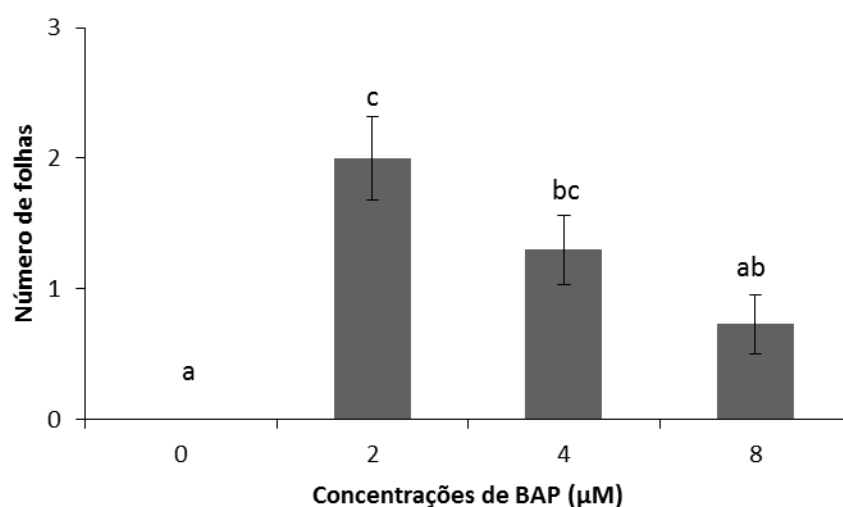


Figura 13 Número de folhas em ápices caulinares de *Handroanthus serratifolius* em diferentes concentrações de BAP aos 40 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Houve diferença estatística para o comprimento da parte aérea, ($p < 0,05$), nas diferentes concentrações de BAP utilizadas, sendo que o maior comprimento 3,3 cm foi observado na concentração de 2 µM de BAP. (Figura 14). Vale ressaltar que, assim como para as demais variáveis analisadas, a ausência do regulador de crescimento não acarretou em aumento do comprimento da parte aérea, sendo que os ápices caulinares cultivados sob essas condições não se desenvolveram em brotações.

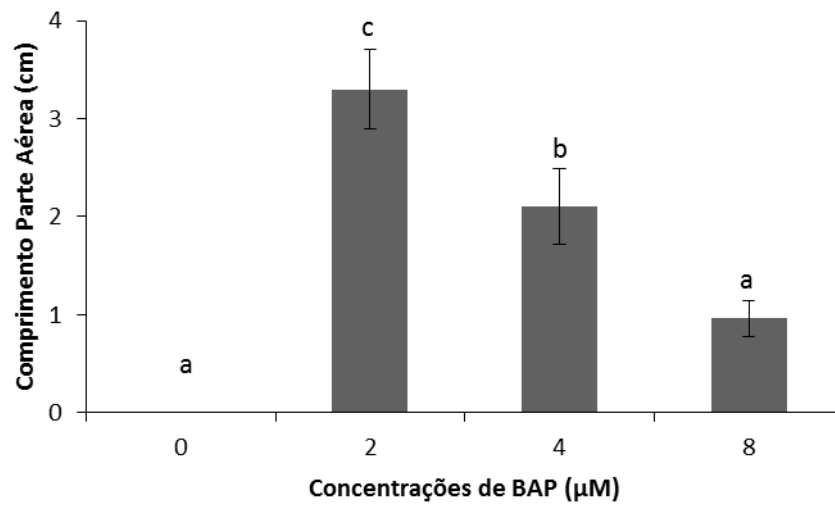


Figura 14 Comprimento da parte aérea em ápices caulinares de *Handroanthus serratifolius* em diferentes concentrações de BAP aos 40 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Jain et al. (2009) observaram que o meio WPM suplementado com 4,4 µM BAP permitiu o crescimento de brotos de 3,3 cm a partir de ápices caulinares de *Harpagophytum procumbens*.

A eficiência no uso do BAP no cultivo *in vitro* de ápices caulinares também foi relatada para a espécie *Ceiba pentandra*, na qual o crescimento de 60% dos ápices foi obtido quando da utilização de 9,7 µM de BAP (SILVA et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

O uso de hipoclorito de sódio (1%) é eficaz na desinfestação dos embriões de *H. serratifolius*. A citocinina BAP é essencial para o crescimento *in vitro* de *H. serratifolius* e a concentração de 2 μ M de BAP favoreceu o maior crescimento médio das brotações, crescimento dos ápices com o maior crescimento da parte aérea e número de folhas.

A regeneração de brotos a partir de raízes foi observada, porém a regeneração não foi obtida de forma expressiva. As concentrações de AIB foram eficazes para a formação de raízes e as concentrações endógenas de auxinas das plantas provavelmente favoreceram para a formação de raiz nas brotações de *H. serratifolius* cultivadas *in vitro*.

A aclimatização foi eficiente com 100% das plantas aclimatizadas.

REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Germinação de sementes de ipê-branco em diferentes substratos e meios de cultura. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 22, n. 3,4 p. 162-167, jul./dez. 2010.
- BIELACH, A. et al. Genetic approach towards the identification of auxin–cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 367, p. 1469–1478, Apr. 2012.
- CAMPOS, V. C. A. et al. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n.4, p.639-644, abr. 2013.
- CARDOSO, J. C.; DA SILVA, J. A. T. Micropropagation of *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) an endangered endemic medicinal species from the Brazilian cerrado biome. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Oxon, v. 49 p. 710–716, 2013.
- CRUZ, A. C. F. et al. *In vitro* organogenesis from root culture segments of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Oxon, v. 50, p. 76-83, Nov. 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3th. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1. 520 p.
- 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-CNPq, 1998. p. 183-260.
- JAIN, N. et al. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip in *Harpagophytum procubens*. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v.75, n. 1, p.117-121, Nov. 2009.

- KLERK, G. J. Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, Oxon, v. 38, n. 5, p. 415–422, Sept. 2002.
- LASKOWSKI, M. et al. Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLOS Biology*, Davis, v.6, n.12, p. 2721–2735, Dec. 2008.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, Washington, v. 30, p. 421–427, May/June 1980.
- MALLÓN R.; RODRÍGUEZ-OUBIÑA J.; GONZÁLEZ M. L. Shoot regeneration from *in vitro*-derived leaf and root explants of *Centaurea ulreia*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. Dordrecht, v.106, p. 523–530, Feb. 2011.
- MARTINS, J. P. R. et al. Multiplicação *in vitro* de explantes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (MART.) STANDL.). In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9. 2009, São Lourenço. *Anais...* São Lourenço: SEB, 2009.
- MULLER, D.; LEYSER, O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany*, Oxford, n. 107, n. 7, p. 1203–1212, Feb. 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissuecultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473–497, July 1962.
- NERY, M. C. et al. 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.
- PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. A micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. from root explants. *Acta Physiology Plantarum*, Aligarh, v. 33, p. 789–796, Jan./Nov, 2011.

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

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

ROCHA, D. I. et al. Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Dordrecht. v.111, p.69–78, May 2012.

SAHAI A.; SHAHZAD, A.; SHARMA, S. Histology of organogenesis and somatic embryogenesis in excised root cultures of an endangered species *Tylophora indica* (Asclepiadaceae). **Australian Journal Botany** Collingwood, v.58, n. 3, p. 198–205, May 2010.

SALUSTIANO, E. S. J. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alaphapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational New Drugs**, Bethesda, v. 28, n. 2, p.139-44, Apr. 2010.

SANTANA, J. R. F. et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 80-86, jan./fev. 2008.

SILVA, C. V. et al. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht. v.107, p. 407–416, 2011.

SILVA, P. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). **Scientia Agraria**, Curitiba, n. 11, p. 437-443, nov./dec. 2010.

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n.4, p.1048-1053, jul./ago. 2007.

TORRES, A. C; CALDAS, L. S.; BUZZO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v.1, 864p.

YANG, J. L. et al. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v.100, n.1, p. 49–58, Jan. 2010.

CAPÍTULO 3

CRIOPRESERVAÇÃO DE *Handronathus serratifolius*

RESUMO

Handroanthus serratifolius é uma espécie arbórea com ampla distribuição no Brasil, utilizada como uma planta ornamental. É propagada por sementes, que perdem a viabilidade em curto prazo. Este estudo teve como objetivo criopreservar sementes, embriões e ápices caulinares de *Handroanthus serratifolius*. Para a criopreservação das sementes, estas foram colocadas em tubo Falcon (15 mL) e armazenadas em nitrogênio líquido durante três dias antes do descongelamento por 1, 3 ou 5 minutos em banho maria a 38 ± 2 °C. Após a criopreservação, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% durante 30 segundos e hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), durante 10 minutos, seguido por inoculação (P1), ou os embriões foram extraídos, desinfestados em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por um minuto (P2), ambos foram inoculados em meio MS contendo $1,44 \mu\text{M}$ de GA_3 . Após 30 dias, a porcentagem de germinação, o comprimento da parte aérea de mudas provenientes de ambos os procedimentos (P1 e P2) e a massa fresca e seca da parte aérea e de raízes de mudas originadas de P2 foram avaliados. Para a criopreservação de embriões, estes foram desinfestados em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por um minuto e posteriormente desidratados durante 0 a 300 minutos em câmara de fluxo laminar antes do armazenamento em nitrogênio líquido por sete dias e em seguida, descongelados em banho-maria 38 °C durante 1, 3 ou 5 minutos. Os embriões foram descongelados e inoculados em meio MS contendo $1,44 \mu\text{M}$ de GA_3 . A porcentagem de germinação e o comprimento da parte aérea foram avaliados. Para a criopreservação dos ápices caulinares, foram testados diferentes tempos de imersão (15, 30, 60 e 120 minutos) em PVS2 antes da imersão em nitrogênio líquido utilizando a técnica de *droplet vitrification*. Após o descongelamento, foi avaliada a retomada do crescimento dos ápices. Observou-se que apenas 10% das sementes submetidas a P1 e criopreservadas germinaram em comparação com 95% de germinação dos embriões submetidos a P2. Os resultados mostraram ainda que o descongelamento realizado por um minuto foi eficaz na criopreservação de sementes. Para a criopreservação de embriões, observou-se que o percentual de germinação superior a 85% foi obtido em embriões desidratados para um teor de umidade menor que 10% antes da exposição ao nitrogênio líquido. Para a criopreservação de ápices caulinares, maior porcentagem de retomada de crescimento após imersão em nitrogênio líquido foi obtida quando os explantes foram anteriormente imersos por 30 minutos na solução de PVS2.

Palavras-chave: Conservação. Cultivo *in vitro*. Plantas ornamentais. Armazenamento em longo prazo.

ABSTRACT

Handroanthus serratifolius is a tree species with wide distribution in Brazil and used as an ornamental plant. It is propagated by seeds, which lose viability in the short term. This study aimed to cryopreserve seeds, embryos and shoot tips of *Handroanthus serratifolius*. For cryopreservation these seeds were placed in Falcon tube (15 ml) and stored in liquid nitrogen for three days before thawing for 1, 3 or 5 minutes in a water bath at 38 ± 2 °C. After cryopreservation the seeds were decontaminated in 70% alcohol for 30 seconds and sodium hypochlorite (2 % active chlorine) for 10 minutes (P1), or the embryos were extracted, decontaminated in sodium hypochlorite (1 % active chlorine) for one minute (P2), both were inoculated on MS medium containing 1.44 μM of GA_3 . After 30 days, the percentage of germination, the shoot length of seedlings from both procedures (P1 and P2) and fresh and dry weight of shoots and roots of seedlings originating from P2 were evaluated. For cryopreservation, embryos were decontaminated with sodium hypochlorite (1 % active chlorine) for one minute and then dehydrated for 0 to 300 minutes in a laminar flow cabinet before storage in liquid nitrogen for seven days and then thawed in 38 °C water bath for 1, 3 or 5 minutes. The embryos were thawed and cultured on MS medium containing 1.44 μM GA_3 . The germination percentage and shoot length were evaluated. For cryopreservation of shoot tips were tested different immersion times (15, 30, 60 and 120 minutes) PVS2 before immersion in liquid nitrogen using the *droplet vitrification* technique. After thawing, the shoot tips regrowth were evaluated. It was found that only 10% of seeds subjected to P1 and cryopreserved germinated, compared with 95% of the embryos underwent germination of P2. The results also showed that thawing performed for one minute was effective in cryopreservation of seeds. For cryopreservation of embryos was observed that the percentage of greater than 85 % germination was obtained in dehydrated into a moisture content below 10 % before embryos exposure to liquid nitrogen. For cryopreservation of shoot tips, higher percentage of regrowth after immersion in liquid nitrogen was obtained when explants were previously immersed for 30 minutes in PVS2 solution.

Keywords: Conservation. *In vitro* culture. Ornamental plant. Long term storage.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma tecnologia valiosa para a preservação em longo prazo, em que muitos explantes podem ser utilizados, incluindo pólen, sementes, embriões, calos e ápices caulinares (SALAJ, 2011). É uma técnica na qual o material biológico vivo é armazenado em nitrogênio a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ em sua fase líquida, ou a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, em sua fase de vapor. Sob estas temperaturas, o metabolismo celular é praticamente paralisado, diminuindo significativamente a degradação do material (REED, 2008).

Este método tem se mostrado prático e eficiente devido à exigência de pequenos volumes dos materiais armazenados, além da baixa exigência de manutenção. Após a determinação de um protocolo apropriado para cada espécie, a criopreservação permite que armazenamento dos materiais seja realizado por tempo ilimitado (KACZMARCZYK et al., 2011).

Existem diferentes técnicas de criopreservação e a escolha entre uma delas é dependente do explante a ser criopreservado. Além disso, o sucesso do procedimento também será determinado pela elaboração de um meio eficiente de regeneração do explante, no qual ele é inoculado após o descongelamento. Reguladores de crescimento exercem uma função importante nessa etapa, e a concentração e combinação entre eles é muito variável de acordo com a espécie (MUKHERJEE et al., 2009).

A criopreservação de sementes ou embriões zigóticos é feita basicamente por desidratação e resfriamento (PANIS; LAMBARDI, 2005; KAVIANI, 2011). Sementes ortodoxas podem ser desidratadas a 7% de teor de umidade sem que haja perda de viabilidade (ROBERTS, 1973). A criopreservação de embriões zigóticos é uma alternativa, uma vez que o tegumento de algumas sementes podem conter compostos que agem como inibidores de germinação (BEWLEY; BLACK, 1994; SILVA et.al, 2011).

Já para a criopreservação de ápices caulinares, a técnica mais eficiente é a denominada *droplet vitrification*, desenvolvida por Panis; Piette e Swennen (2005), que consiste no pré-tratamento dos explantes com

solução de vitrificação, antes de serem dispostos em tiras de papel alumínio contendo uma gota dessa solução e congelados em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). Soluções de vitrificação são utilizadas para que o material a ser criopreservado assuma um estado vítreo, diminuindo assim a formação de cristais de gelo, prejudiciais à célula. Entretanto, estas soluções possuem níveis de toxicidade que devem ser identificados de acordo com a espécie em questão (REED, 2008).

O reaquecimento das amostras deve ser eficiente para garantir a sobrevivência de explantes após a criopreservação. Métodos de descongelamento não eficientes são frequentemente a principal razão para o insucesso da criopreservação (ENGELMANN, 1997; KARLSSON, 2001). Assim, a criopreservação bem sucedida depende da capacidade do tecido em sobreviver à desidratação e de um processo eficiente de descongelamento (PADRO, 2012).

Neste contexto o objetivo deste estudo foi de criopreservar sementes, embriões e ápices caulinares de *Handroanthus serratifolius*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Sementes de *H. serratifolius* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Lavras, situada a 21° 14' 43 S, 44° 59' 59 W. Os teores de umidade inicial das sementes e/ou embriões (%UI) foram determinados utilizando-se três amostras de 10 sementes e/ou embriões. Após determinação da massa fresca (MF) das amostras, estas foram acondicionadas em folhas de papel e desidratadas em estufa a 105 ± 3 °C durante 72 horas para obtenção da massa seca (MS). A (%UI) foi obtida através da seguinte equação: $\% \text{ UI (MS)} = [(MF - MS) / MF] \times 100$, em que % UI (MS) é a porcentagem de umidade em uma base de massa seca, MF massa fresca (g) e MS massa seca (g). No momento da colheita das sementes, o teor de água de sementes e embriões foi de 5,86% e 5,66% respectivamente.

2.2 Criopreservação de sementes

Sementes de *H. serratifolius* apresentando 5,86% de umidade inicial foram colocadas em tubo Falcon (15 mL) com 20 sementes por tubo, e este foi imerso em nitrogênio líquido (NL).

Após três dias, os tubos contendo as sementes foram retirados do NL e as sementes foram descongeladas com a imersão dos tubos em banho-maria a 40 °C durante 1, 3 ou 5 minutos.

Após o reaquecimento, em câmara de fluxo laminar, dois procedimentos de descontaminação das sementes foram testados:

- (P1) as sementes foram imersas em etanol (70%) durante 20 segundos e, em seguida, imersas em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante 20 minutos.

- (P2) as sementes foram desinfestadas como descrito em P1, os tegumentos removidos e os embriões foram desinfestados em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante um minuto.

Sementes e embriões foram posteriormente lavados três vezes em água destilada e autoclavada e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 1,44 μM de GA_3 (ácido giberélico), 0,09 M de sacarose, gelificado com 7 g L^{-1} de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da esterilização conforme Abbade; Paiva e Paiva (2010). Após 30 dias em sala de crescimento a 25 ± 2 °C sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, foram avaliados a porcentagem de germinação, o comprimento da parte aérea (cm) e a massa fresca e seca (mg) de brotos e raízes.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída de quatro tubos de ensaio com uma semente por tubo. Os dados foram submetidos à ANAVA utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.3 Desidratação e criopreservação de embriões

2.3.1 Teste de desidratação de embriões

Sementes de *Handroanthus serratifolius* foram lavadas em água corrente por 30 minutos e, no início do processo, cinco gotas do detergente Twin 20 foram adicionadas. Após a lavagem, as sementes foram levadas à câmara de fluxo laminar onde foram desinfestadas em álcool 70%, durante 30 segundos e depois em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), durante 10 minutos. O tegumento das sementes foi removido e os embriões foram desinfestados em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante um minuto seguido por três lavagens em água destilada esterilizada.

Após desinfestação, os embriões foram desidratados em câmara de fluxo laminar, à temperatura ambiente e sobre discos de papel filtro esterilizados com 9 cm de diâmetro durante diferentes períodos (0, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, cada repetição constituindo de um disco de papel filtro com dez embriões. Os dados foram submetidos à ANAVA utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

2.3.2 Criopreservação de embriões

Embriões desidratados nos diferentes tempos em câmara de fluxo laminar (sub item 2.3.1) e os não desidratados (controle 1) foram inseridos em tubos Falcon (15 mL) e estes armazenados durante sete dias em NL. Um segundo tratamento controle foi efetuado e consistiu de embriões desidratados nos diversos tempos, além dos não desidratados e não inseridos em NL (não criopreservados).

O reaquecimento foi feito em banho-maria (38 ± 2 °C), durante três diferentes períodos (1, 3 e 5 minutos) e os embriões foram inoculados em meio MS contendo $1,44 \mu\text{M}$ de GA_3 , $0,09 \text{ M}$ de sacarose, solidificado com 0,7% de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da esterilização, conforme descrito por Abbade; Paiva e Paiva (2010).

Após 15 dias em sala de crescimento a 25 ± 2 °C com irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, foram avaliados a porcentagem de germinação e o comprimento da parte aérea (cm).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, cada repetição constituindo de quatro tubos com um embrião cada. Os dados foram submetidos à ANAVA utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

2.4 Criopreservação de ápices caulinares

Foram utilizadas como fonte de explantes plântulas *Handroanthus serratifolius* oriundas da germinação *in vitro*.

Em câmara de fluxo laminar, os ápices caulinares com diâmetro de aproximadamente 1 mm foram excisados e isolados com o auxílio de bisturi e lupa estereoscópica. Para o processo de criopreservação, os ápices caulinares foram imersos por 20 minutos, em solução de carregamento [2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose dissolvido em meio Murashige e Skoog (1962)] à temperatura ambiente. Em seguida, foi testada a imersão em solução de PVS2: 30% de glicerol (p/v), 15% etileno glicol (p/v) e 15% dimetilsulfóxido (DMSO p/v), 0,4 M de sacarose em meio de cultura basal, a 0 °C nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Os ápices foram acomodados em tiras de papel alumínio (1,5 x 0,5 cm) sobre uma superfície gelada antes da imersão em NL. Como tratamento controle utilizou-se ápices não imersos em NL (não criopreservados).

Após 30 minutos em NL, foi realizado o reaquecimento por 15 minutos à temperatura ambiente em solução de descarregamento e, então, os ápices foram inoculados no meio MS contendo 0,3 M de sacarose (meio de pós-cultivo) por 24 h horas. Após este período, os explantes foram transferidos para o meio *Wood Plant Medium* (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980) acrescido de 0,25 µM de ANA, 2 µM de BAP, 10 ppm de ácido ascórbico, 0,09 M de sacarose, gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Após 30 dias em sala de crescimento a 25 ± 2 °C com irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, foram avaliados a porcentagem da retomada de crescimento dos ápices caulinares.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado constituído de três repetições independentes por tratamento, cada repetição composta por sete ápices caulinares criopreservados e três ápices do tratamento controle (sem imersão no NL). Os dados foram

transformados através do arcosseno da porcentagem inicial antes da realização da ANAVA e analisados por regressão ($p < 0,05$), utilizando o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Criopreservação de sementes

O teor de umidade inicial das sementes colhidas logo após a dispersão foi de aproximadamente 5% com base de massa seca. Para a porcentagem de germinação, os período de descongelamento testados não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$). Já para os dois procedimentos de descontaminação testados (P1 e P2), foi observada diferença significativa (Figura 1). Sementes oriundas de P1 apresentaram apenas 10% de germinação, enquanto que 95% dos embriões oriundos de P2 germinaram com sucesso após 30 dias de cultivo.

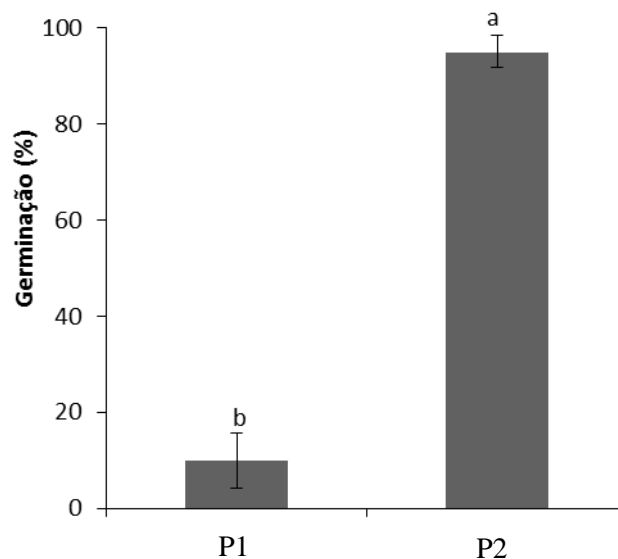


Figura 1 Porcentagem de germinação de sementes e embriões oriundos de diferentes procedimentos de descontaminação (P1 e P2) após 30 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$).

A umidade das sementes é um dos principais fatores que afetam a criopreservação (WALTERS; WHEELER; STANWOOD, 2004). Tresena et al. (2010) trabalhando com a criopreservação de sementes de uma outra

espécie de ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotrica*), observaram que quanto menor o teor de água, melhor a germinação e vigor das sementes expostas ao nitrogênio líquido.

A menor taxa de germinação das sementes criopreservadas oriundas de P1 em relação às de P2, no presente trabalho, pode estar relacionada com a presença dos tegumentos. Existem relatos de que os compostos fenólicos presentes no tegumento das sementes podem inibir a germinação (BEWLEY; BLACK, 1994). Salomão (2002) obteve 93% de germinação de sementes de *T. serratifolia* após exposição ao LN. Goldfarb; Duarte e Mata (2010) trabalhando com sementes de *Jatropha curcas* L. com diferentes teores de umidade, observaram que, após 90 dias em NL, a porcentagem de germinação das sementes manteve-se estável.

Para a variável comprimento da parte aérea, observou-se a interação significativa entre os procedimentos de desinfestação (P1 e P2) e os diferentes períodos de reaquecimento de 1, 3 e 5 minutos ($p < 0,05$) (Figura 2). Plântulas oriundas de P2 apresentaram maiores comprimentos de parte aérea quando comparadas a plântulas oriundas de P1, em todos os períodos de descongelamento testados. Os tempos de descongelamento que apresentaram maior comprimento de parte aérea em plântulas oriundas de P2 foram 1 e 5 minutos. Entretanto, não foi observada diferença para essa variável nos diferentes tempos de descongelamento em plântulas oriundas de P1 (Figura 2).

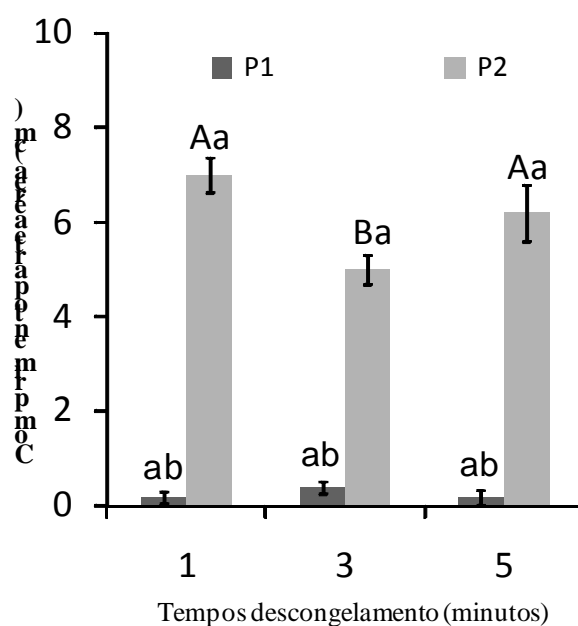


Figura 2 Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas oriundas de sementes criopreservadas e posteriormente desinfestadas utilizando-se dois procedimentos (P1 e P2) em diferentes períodos de descongelamento. Letras maiúsculas comparam os diferentes tempos de descongelamento no procedimento de descontaminação P2. Letras gregas comparam os diferentes tempos de descongelamento no procedimento de descontaminação P1. Letras minúsculas comparam os diferentes procedimentos de descontaminação em cada tempo de descongelamento. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

O descongelamento rápido em banho-maria (35 - 40 °C) por um curto período é crucial para melhorar a germinação (GALDIANO JÚNIOR, 2012).

Higa (2011) obteve 53,6 % de germinação de sementes de *T. heptaphylla* (Bignoniaceae) criopreservadas e descongeladas em banho-maria a 45 °C, durante 3 minutos e plântulas com uma altura média de 3,8 cm após 90 dias de cultivo no solo.

Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para massa fresca e seca de plântulas, independentemente do período de descongelamento, entre parte aérea e raízes com valores médios de 485,2 e 802,4 mg

respectivamente, para massa fresca (Figura 3A) e 61 mg e 100 mg respectivamente, para massa seca (Figura 3B).

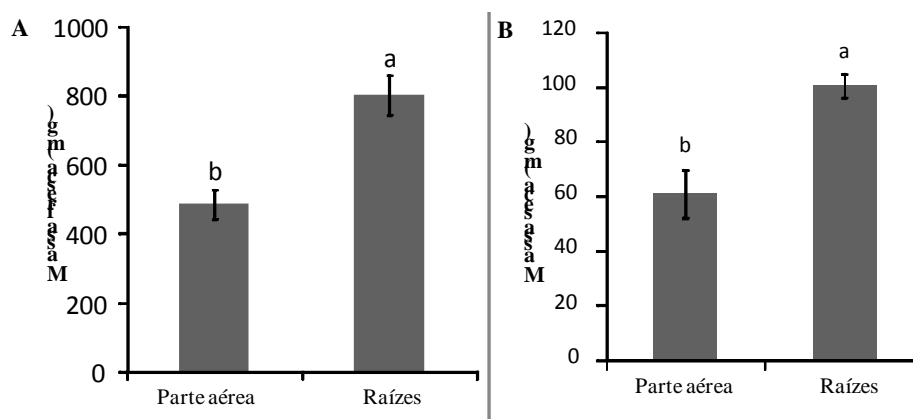


Figura 3 Massa fresca (A) e seca (B) da parte aérea e de raízes de plântulas oriundas de sementes criopreservadas e desinfestadas pelo procedimento P2, após 35 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com relação à massa seca das plântulas, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de descongelamento testados (Figura 4).

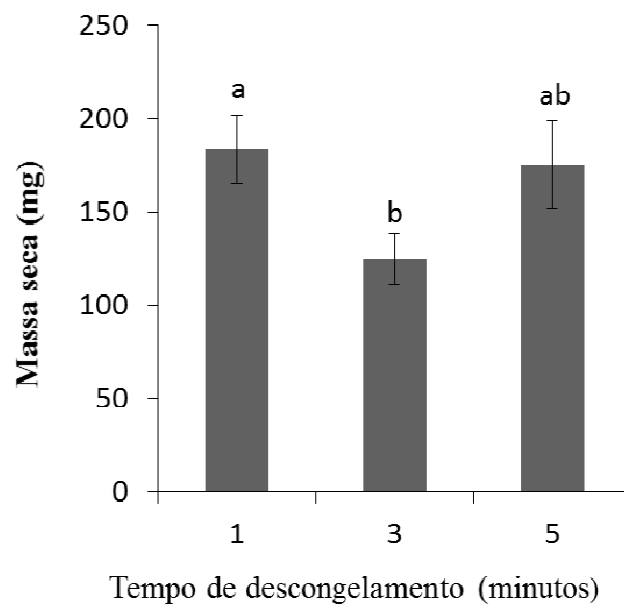


Figura 4 Massa seca de plântulas oriundas de sementes criopreservadas e descontaminadas pelo procedimento P2, após 35 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao estudar a criopreservação de sementes de *Ricinus communis*, Almeida et al. (2002) observaram uma redução na germinação e peso seco de plântulas oriundas de sementes que antes da criopreservação apresentavam teor de água de 12% em relação àquelas com teores de 4, 6, 8 e 10%.

Martins et al. (2009) afirmaram que as sementes de ipê-roxo *Tabebuia impetiginosa* podem ser previamente desidratadas a 4,2% de água e posteriormente imersas em nitrogênio líquido por, pelo menos, 360 dias sem redução na qualidade fisiológica.

3.2 Criopreservação de embriões

3.2.1 Teste de desidratação dos embriões

O teor de umidade dos embriões diminuiu significativamente durante o tempo de desidratação em câmara de fluxo laminar. Embriões não desidratados apresentaram teor de umidade de 28,6% e chegou a 12,8% e 5% após 60 e 300 minutos de desidratação respectivamente (Figura 5).

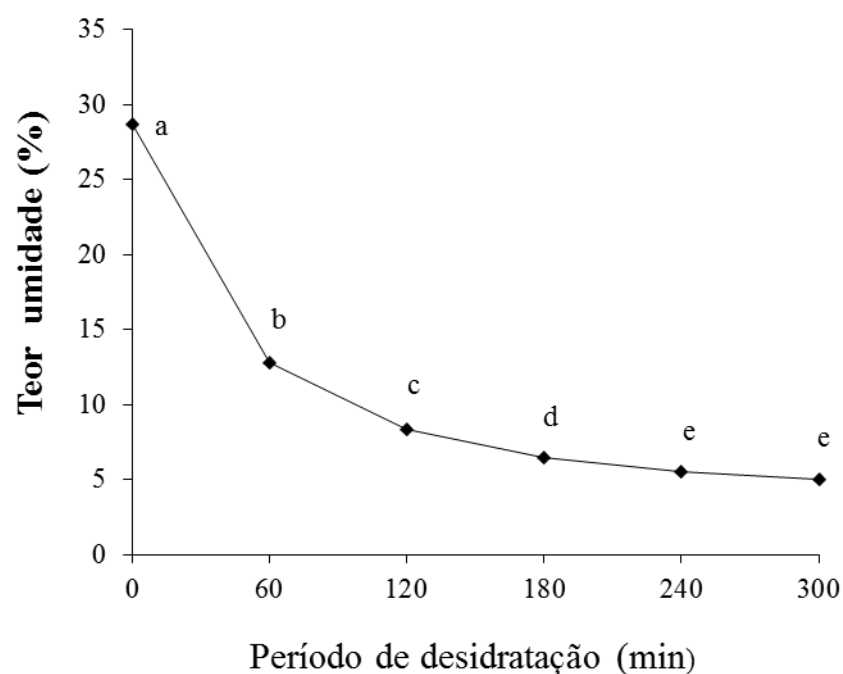


Figura 5 Teor de umidade de embriões de *H. serratifolius* submetidos à diferentes períodos de desidratação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Roberts (1973) relatou que as sementes ortodoxas podem ser secas a um teor de umidade baixo, geralmente menos de 7%, sem perda de viabilidade.

O teor de umidade é um dos pontos mais críticos contra a criopreservação. Os problemas relacionados com a cristalização da água e recristalização, durante o congelamento ou o descongelamento, poderiam levar à morte celular devido à formação de gelo (MAZUR, 1984).

3.2.2 Criopreservação de embriões

De maneira geral, embriões oriundos do tratamento controle 2 (desidratados nos diferentes tempos, não desidratados e não expostos ao NL) obtiveram porcentagem de germinação de 100%. Exceção foi observada no tratamento de desidratação de embriões em câmara de fluxo laminar por 300 minutos que apresentaram média de 90% de germinação, mesmo não expostos ao NL (Figura 6).

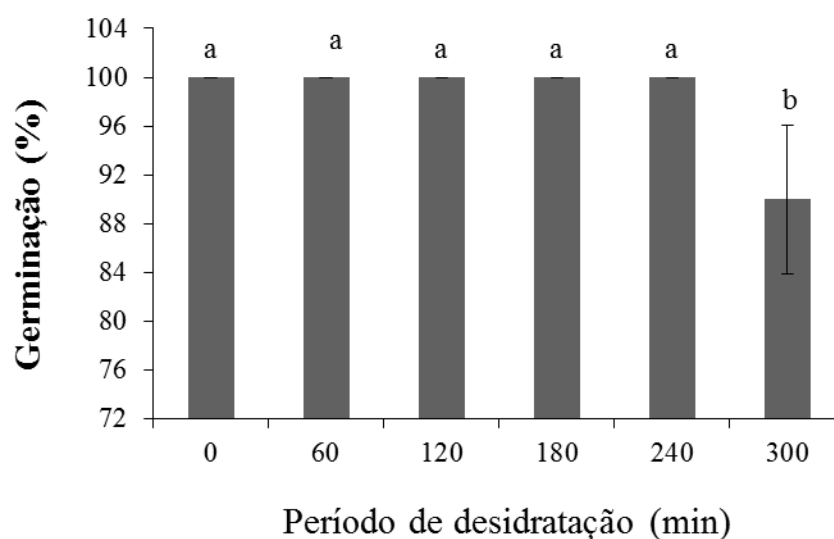


Figura 6 Porcentagem de germinação de embriões *H. serratifolius* desidratados em câmara de fluxo laminar em diferentes períodos e não submetidos à criopreservação, após 15 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A menor porcentagem de germinação observada foi no maior tempo de desidratação (300 minutos). Uma menor germinação em embriões secos

por 300 min pode surgir de danos durante a embebição de sementes extremamente secas (BEARDMORE; WHITTLE, 2005).

A viabilidade dos embriões expostos ao NL foi dependente do período de desidratação ($p < 0,05$) abaixo de 10% de umidade e, independentemente, do tempo de reaquecimento. Embriões não desidratados e desidratados por 60 minutos apresentaram coloração escura (Figura 7) e não germinaram após descongelamento (Figura 8). Em contraste, a germinação dos embriões desidratados de 120 a 300 minutos e exposto ao NL foi de cerca de 90% (Figura 8), e estes apresentaram coloração clara (Figura 7).

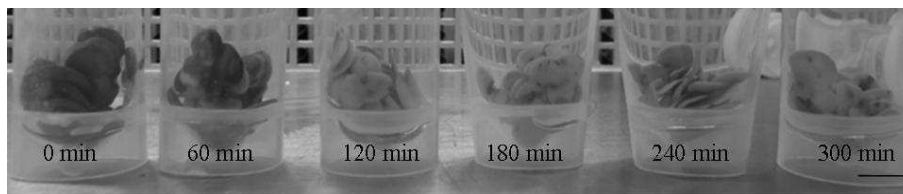


Figura 7 Embriões de *H. serratifolius* desidratados em diferentes períodos expostos ao NL e descongelados por 5 minutos. Barra = 10 mm.

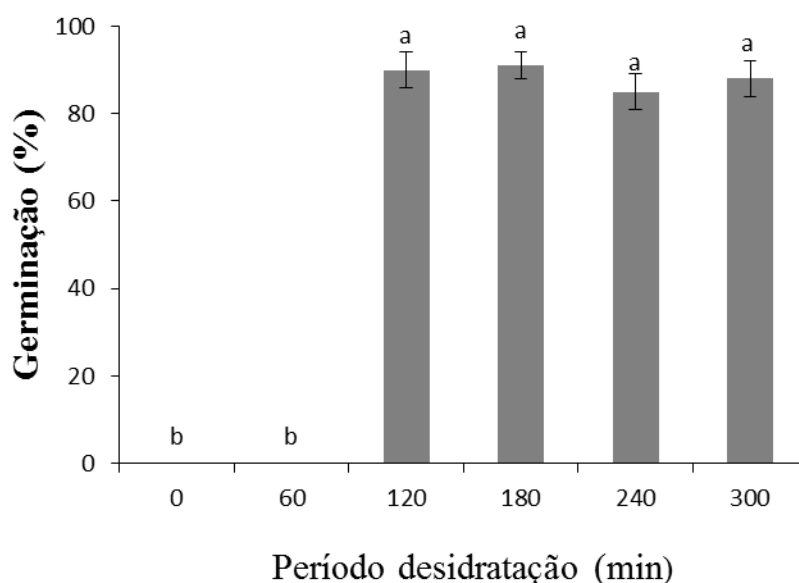


Figura 8 Porcentagem de germinação de embriões de *H. serratifolius* desidratados em câmara de fluxo laminar em diferentes períodos e submetidos à criopreservação, após 15 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O tempo de desidratação não afetou o comprimento da parte aérea de embriões que não foram expostos à NL. No entanto, o tempo de desidratação apresentou efeito significativo sobre o comprimento da parte aérea de embriões expostos ao NL ($p < 0,05$) independentemente do tempo de descongelamento. Embriões desidratados por pelo menos 180 minutos apresentaram maior comprimento de parte aérea quando comparado aos demais tempos. O comprimento da parte aérea, para a maioria dos tempos de dessecação testados, apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os embriões criopreservados (+NL) e não criopreservados (-NL). Maior comprimento de parte aérea foi observado em embriões não expostos ao NL, com exceção daqueles desidratados por 180 e 300 minutos em que não houve diferença entre os embriões criopreservados ou não (Figura 9).

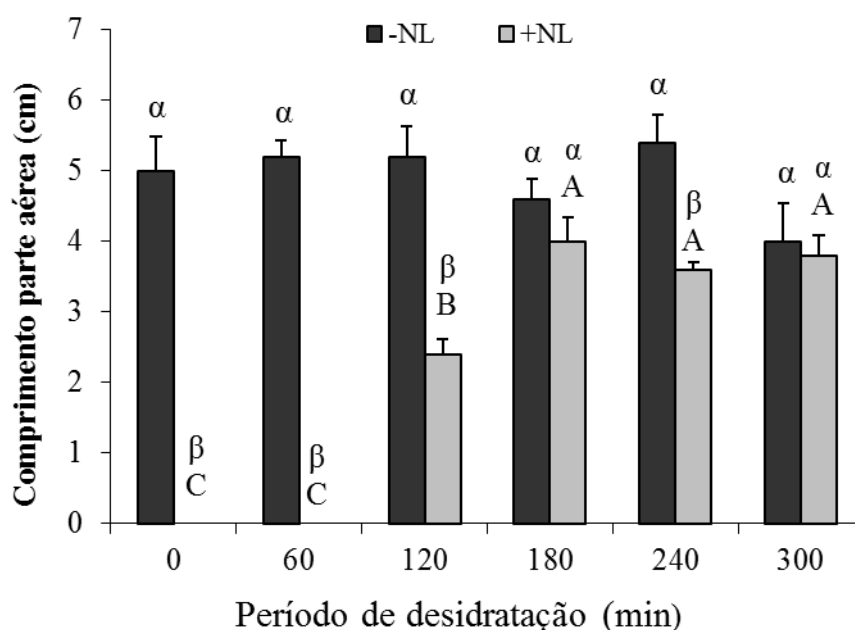


Figura 9 Comprimento da parte aérea de plântulas de *H. serratifolius* após 15 dias de cultivo, oriundas de embriões desidratados por diferentes períodos em câmara de fluxo laminar e exposto (+ NL) ou não (-NL) ao nitrogênio líquido. Letras gregas são comparações dos tratamentos expostos e não expostos ao NL para cada período de desidratção. Letras maiúsculas são comparações dos tratamentos expostos ao NL nos diferentes períodos de desidratção. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Protocolos de criopreservação de embriões foram utilizados para outras espécies, incluindo o de Radha; Decruse E Krishnan (2010) que relataram 60% de germinação de *Nothapodytes nimmoniana* após criopreservação de embriões desidratados por 120 minutos em câmara de fluxo laminar. Já em um estudo realizado por Nogueira et al. (2011), com a espécie *Byrsonima intermedia*, foi relatado que apenas 10% dos embriões zigóticos submetidos à criopreservação sobreviveram. Os autores afirmaram que antes da exposição ao NL os embriões apresentavam 15% de umidade.

Altas taxas de sobrevivência são geralmente obtidas em amostras expostas ao NL que tenham sido desidratadas com conteúdo de água entre 10 e 20% (ENGELMANN, 2004; WOWK, 2010).

3.3 Criopreservação de ápices caulinares

Foi possível observar que a retomada de crescimento dos ápices caulinares foi significativamente afetada pelo tempo de exposição à solução de PVS2 e imersão ou não ao NL. Ápices caulinares não criopreservados apresentaram maiores taxas de retomada de crescimento se comparados aos explantes criopreservados quando da exposição à solução de PVS2 em até 60 minutos. Quando os explantes foram imersos por 120 minutos em solução de PVS2, não houve diferença entre os imersos ou não em NL (Figura 10).

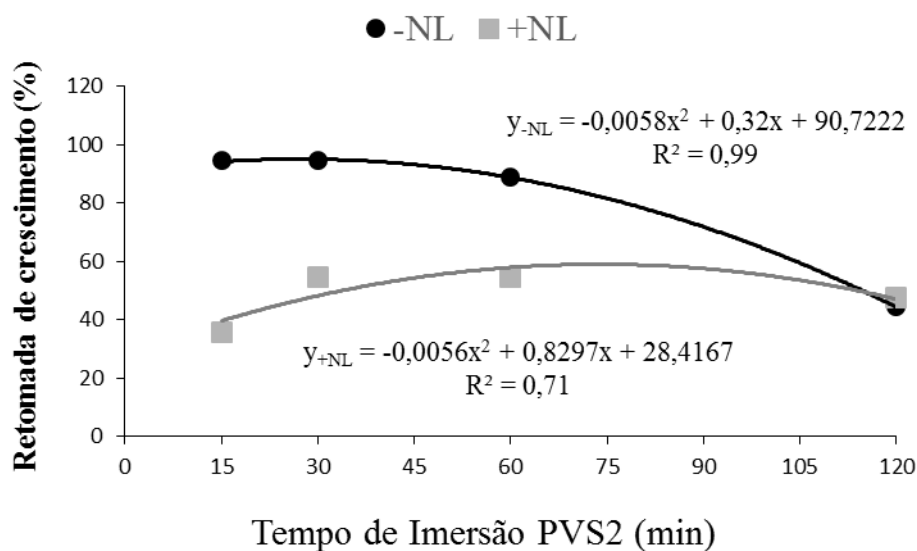


Figura 10 Porcentagem de retomada de crescimento de ápices caulinares de *H. serratifolius* submetidos a diferentes tempos de imersão e não imersos em nitrogênio líquido (-NL) ou criopreservados (+NL) pela técnica de *droplet-vitrification* após pré-cultivo por 24 horas em meio de cultura contendo 0,3 M de sacarose.

Ápices caulinares submetidos à criopreservação apresentaram maior porcentagem de retomada de crescimento (54,8%) quando anteriormente imersos em solução de PVS2 por 30 minutos. Já a imersão dos ápices por 15

minutos em PVS2 promoveu retomada de crescimento de 35,8% dos explantes criopreservados (Figura 1).

A imersão dos ápices caulinares durante 15 minutos em solução de vitrificação provavelmente não foi suficiente para promover desidratação ideal e dessa forma, células com alto conteúdo de água livre, quando expostas ao NL, podem sofrer danos irreversíveis nas membranas devido aos efeitos da cristalização (MAZUR, 1984; SURANTHRAN et al., 2012). O uso da solução PVS2 permite não apenas a desidratação, essencial para evitar a cristalização da água, mas também promove efeitos de crioproteção e de redução na mobilidade de moléculas, permitindo que as células vitrifiquem durante a imersão em NL (VOLK; WALTERS, 2006).

Crioprotetores podem ser tóxicos às células (FULLER, 2004) e as substâncias que compõem o PVS2, principalmente o DMSO (dimetilsufóxido), podem levar à morte celular, especialmente se a imersão ocorrer em temperaturas superiores a 0 °C ou se o período de exposição for muito prolongado (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; FULLER, 2004). Provavelmente no presente trabalho, a imersão dos ápices por um período de 120 minutos em PVS2 causou toxicidade às células resultando na baixa porcentagem de retomada de crescimento observada nos explantes não imersos em NL.

Vale ressaltar que o sucesso da criopreservação está relacionado com o balanço hídrico nas células e o uso de substâncias crioprotetoras (VOLK e WALTERS, 2006).

4 CONCLUSÕES

A criopreservação de *H. serratifolius* foi obtida com sucesso.

Um minuto em banho-maria a 38 °C é eficaz para o descongelamento de sementes criopreservadas e a remoção do tegumento das sementes é essencial para promover uma alta taxa de germinação *in vitro* de sementes de *H. serratifolius* criopreservadas.

Embriões podem ser criopreservados com sucesso e atingir porcentagens de germinação superior a 85%. Quando desinfestados com soluções aquosas, devem ser novamente desidratados ao conteúdo de água inferior a 10% antes da criopreservação.

A máxima taxa de retomada de crescimento para ápices caulinares criopreservados (54,8%) é atingida após o tratamento por 30 minutos na solução de PVS2.

PERSPECTIVAS

Os experimentos realizados permitiram desenvolver protocolos eficientes de organogênese e criopreservação para a multiplicação e conservação da espécie *Handroanthus serratifolius*. Com os resultados promissores obtidos será possível a criação de um banco de germoplasma *in vitro* para o armazenamento desta espécie que apresenta grande valor ornamental e medicinal. Entretanto, para a concretização a otimização de protocolos descritos tornam-se necessárias.

Estudos sobre a regeneração de brotos utilizando outros reguladores de crescimento se fazem necessários uma vez, que neste estudo foi observada a regeneração, mas em pequena escala.

O estabelecimento de protocolos para a o crescimento da raiz *in vitro* e de uma eficiente regeneração de brotos a partir deste tipo de explante, permitirá uma nova linha de pesquisas que poderá se concentrar na criopreservação de ápices radiculares de *H. serratifolius*, permitindo, portanto, outra opção de armazenamento em criobancos.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. Germinação de sementes de ipê-branco em diferentes substratos e meios de cultura. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 22, n. 3-4, p. 162-167, jul./dez. 2010.

ALMEIDA, F. A. C. et al. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.2, p. 295-302, jan./abr. 2002.

BEARDMORE, T., WHITTLE, C. A. Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes. **Tree Physiology**, Victoria, v.25, p.965-972, Aug. 2005.

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

ENGELMANN, F. In vitro conservation methods In: CALLOW, J. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. (Ed.). **Biotechnology and plant genetic resources**. Wallingford: Cab International, 1997. p.119-161.

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

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 47, n.1, p.5-16, Feb/Dec. 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, London, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

GALDIANO JUNIOR, R. F. et al. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000 **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.148, p, 154 –160, Dec. 2012.

GOLDFARB, M., DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 1, p. 27-33, mar. 2010

HIGA, T. C. Developing seed cryobank strategies for *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae), a hardwood tree of the Brazilian south Atlantic Forest. **CryoLetters**, London, v.32, n.4, p.329-338, July/Aug. 2011.

KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species-what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v. 47, p. 17-25, Feb. 2011.

KARLSSON, J. O. M. A theoretical model of intracellular devitrification. **Cryobiology**, Chicago, v.42, n. 3, p.154-169, May 2001.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 6, p. 778-800, June 2011.

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

MARTINS, L. et al. Conservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.31, n. 2, p.071-076, 2009.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 247, n. 3 part 1, p. C125–C142, 1984.

MUKHERJEE, P. et al. Cryopreservation of Asian *Dioscorea bulbifera* L. and *D. alata* L. by vitrification: importance of plant growth regulators. **Cryo Letters**, Lewes; v.30, n. 2, p. 100-11, Mar./Apr. 2009.

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

NOGUEIRA, G. F. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. embryos using different moisture contents. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 908, p.199-202, 2011.

PADRO, M. D. A. et al. Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 108, n.1, p.167-172, Jan. 2012.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants: crops and forest trees. **The Role of Biotechnology**, Turin, v. 5, n. 7, p. 43-54, Mar. 2005.

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

RADHA, R. K., DECRUSE, S. W.; KRISHNAN, P. N. Cryopreservation of excised embryonic axes of *Nothapodytes nimmoniana* (Graham) Meberly - A vulnerable medicinal tree species of the Western Ghats. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v.9, p. 435-437, Oct. 2010.

REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v.47, p.1-4, July/Aug. 2011

REED, B. M. **Plant Cryopreservation: A Practical guide**. New York: Springer, 2008.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

SALAJ, T. et al. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n.1, p. 55-61, July 2011.

SALOMÃO, A. N. Tropical seeds species responses to liquid nitrogen exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v.14, n.2, p.133–138, 2002.

SILVA, D. G. et al. Physiological and biochemical properties changes during storage of *Tabebuia serratifolia* seeds. **Cerne**, Lavras, v. 17, n.1, p.1-7, Jan./Mar. 2011.

SURANTHRAN, P. et al. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. **Plant Growth Regulator**, Dordrecht, v.66, n.2, p. 101-109, Mar. 2012.

TRESENA, N. L. et al. Determinação do teor de água limite para criconservação das sementes de ipê amarelo (*Tabebuia chrysotrica* (Mart. Ex. DC.) Standl.). **Cerne**, Lavras, v.16, n.2, p.171.175, abr./jun. 2010.

VOLK, G.M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, San Diego, v.52, p.48-61, Feb. 2006

WALTERS, C., WHEELER, L.; STANWOOD, P. C. Longevity of cryogenically stored seeds. **Cryobiology**, San Diego, n. 48, v.3, p. 229-244, June 2004.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, San Diego, v.60, p.11-22, June 2010.