

TARSIS DE AGUIAR

**CONSERVAÇÃO DE SEMENTES ZIGÓTICAS E CULTURA *IN VITRO* DE
ESPÉCIES DE *TABEUIA* GOMES EX DC. (BIGNONIACEAE).**

**FLORIANÓPOLIS – SC
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**CONSERVAÇÃO DE SEMENTES ZIGÓTICAS E CULTURA *IN VITRO* DE
ESPÉCIES DE *TABEBUIA* GOMES EX DC. (BIGNONIACEAE).**

TARSIS DE AGUIAR

**FLORIANÓPOLIS – SC
2010**

TARSIS DE AGUIAR

**CONSERVAÇÃO DE SEMENTES ZIGÓTICAS E CULTURA *IN VITRO* DE
ESPÉCIES DE *TABEBUIA* GOMES EX DC. (BIGNONIACEAE).**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Viana
Co-orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Zenilda Laurita Bouzon
Prof^º. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

**FLORIANÓPOLIS
2010**

TERMO DE APROVAÇÃO

TARSIS DE AGUIAR

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES ZIGÓTICAS E CULTURA *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE *TABEBUIA GOMES EX DC.* (BIGNONIACEAE).

Dissertação julgada e aprovada em 30/09/2010 sua forma final, pelo Orientador e Membros da Comissão Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Centro de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a Ana Maria Viana
Presidente e Orientadora (Depto. de Botânica, CCB, UFSC)

Prof^a. Dr^a Zenilda Laurita Bouzon
Co-orientadora (Depto. de Biologia Celular, CCB, UFSC)

Prof. Dr. Lirio Luiz Dal Vesco
Membro titular (UFSC, campus de Curitibanos)

Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Membro titular (Depto. de Fitotecnia, CCA, UFSC)

Florianópolis, setembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, sempre presente desde o início de minha vida.

Aos meus familiares, pelo amor e apoio incondicional.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela oportunidade de realizar o curso.

À Prof^ª Dr^ª Ana Maria Viana, pela orientação, dedicação, paciência, incentivo, e ensinamentos transmitidos para realização deste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Zenilda Laurita Bouzon, pelo tempo dedicado e pelas oportunidades concedidas.

Aos professores que aceitaram gentilmente fazer parte da banca deste trabalho.

Aos professores Dr. Marcelo Maraschin e Dr. Robert Verpoorte, pelos ensinamentos sobre metabólômica.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, que tentaram da melhor forma possível transmitir seus conhecimentos.

Ao coordenador Prof. Paulo Antunes Horta Junior, pelas discussões durante os seminários e pela transparência em relação aos assuntos burocráticos do curso.

À Vera Lúcia Araújo de Mello Zapelini, secretária do curso, pela disposição e eficiência.

Aos funcionários desta universidade, em especial Eliana de Medeiros Oliveira com pelo auxílio na obtenção imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos colegas de mestrado, Lidiane Ângela Scariot, Ticiane Rover, Carmen Simioni Zitta, Anderson Santos de Mello, Cássio Daltrini Neto, Éder Carlos Schmidt, Thaysi Ventura de Souza, Rafaella de Paula Tavares, Elisa Serena Gandolfo Martins e Caroline Heinig Voltolini, pelo apoio nos momentos de dificuldades.

Às amigas de república Andrenizia Aquino Eluan, Christiane Fabíola Momm, Danielle Fernandes Amaro dos Santos, Sandra Cristina Gomes e Tamires Alano Formentin pela convivência harmônica.

Aos amigos e amigas do coração, Helton João Muller, Nogales Tomé, Leandro F. Cavalcante, Giovani M. de Luca, Ioruá G. Serrano, Francini Barni, Gabriela F. Cavalcante, Zanandréia Rodrigues, pela possibilidade de compartilhar alegrias.

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

"Ontem floriste como por encanto,
sintetizando toda a primavera;
mas tuas flores, frágeis entretanto,
tiveram o esplendor de uma quimera.
Como num sonho, ou num conto de fada,
se transformando em névea cascata,
tuas florzinhas, em sutil balada,
caíam como se chovesse prata..."

Sílvia Ricciardi

RESUMO

As espécies *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Grisebach, *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand., e *Tabebuia pentaphylla* (Linnaeus) Hemsley são arbóreas, tropicais, e pertencem à família *Bignoniaceae*. Estas espécies apresentam benefícios ambientais e econômicos, auxiliando na recuperação de áreas degradadas, e destacam-se também por suas utilizações para fins ornamentais e medicinais (extração de Lapachol). A propagação destas espécies ocorre principalmente por sementes, que apresentam curto período de viabilidade dependendo das condições de armazenamento. Portanto, a disponibilidade de sementes não é constante sendo urgente a necessidade de se desenvolver métodos eficientes para propagação e conservação de germoplasma vegetal. No presente estudo sementes das espécies *T. roseoalba* e *T. pentaphylla* foram submetidas a diferentes períodos e temperaturas de armazenamento (nitrogênio líquido -196°C; freezer -20°C; congelador 0°C; geladeira 5°C; e temperatura ambiente 25°C) e analisados os efeitos sobre a germinação, o teor de água das sementes, e o crescimento inicial de plântulas. Foram também aplicadas técnicas biotecnológicas utilizando-se as espécies *T. avellanedae* e *T. roseoalba*, com a finalidade de testar os efeitos de reguladores de crescimento na propagação *in vitro* e indução de culturas de calos para estudos sobre metabólitos secundários. A viabilidade das sementes de *T. roseoalba* decresceu 14,4% na quarta semana de armazenamento em temperatura ambiente em relação ao armazenamento em geladeira, porém para a espécie *T. pentaphylla* isto foi detectado apenas a partir de 40 dias de armazenamento. O teor de água de sementes de *T. roseoalba* diminuiu de 8,4% para 6,6%, após 10 meses de armazenamento em geladeira, com diminuição da viabilidade e queda nos índices de velocidade de germinação e ao contrário, sementes de *T. pentaphylla* não sofreram queda na viabilidade após 15 meses de armazenamento, mesmo com a redução do teor de água de 7,1% para 4,8%. Os resultados dos experimentos de criopreservação obtidos para *T. roseoalba* e *T. pentaphylla*, permitiram concluir a eficácia desta metodologia na produção de plantas normais a partir das sementes criopreservadas. Após o processo de criopreservação as sementes da espécie *T. roseoalba* foram submetidas à temperatura ambiente ou geladeira por apenas uma semana e foram novamente criopreservadas sem que a viabilidade fosse prejudicada, enquanto que para *T. pentaphylla* as sementes permaneceram por até 3 semanas. Para o estabelecimento de sistemas de cultura *in vitro* foi utilizado o hipoclorito de sódio com sucesso na desinfecção de sementes e obtenção de plântulas axênicas. Como meio de cultura padrão foi utilizado o meio de cultura MS, que assegurou respostas satisfatórias de

germinação, estabelecimento, crescimento e manutenção de plântulas ou explantes das espécies *T. roseoalba* e *T. avellanae*. Aos 50-52 dias após a inoculação das sementes, as plântulas de *T. roseoalba* produziram 1,83 nós foliares/plântula, enquanto que as plântulas de *T. avellanae* 2,73 nós foliares/plântula, todas com capacidade de prover explantes para os experimentos com os reguladores de crescimento exógenos. Sistemas eficientes de cultura de ramos a partir do cultivo de nós apicais, foliares e cotiledonares foram induzidos para *T. avellanae* com 2,5 μM de BAP, sendo os melhores resultados obtidos com o explante nó cotiledonar. Entretanto, tanto o BAP como cinetina foram eficazes no estabelecimento das culturas de ramos em *T. avellanae*. O ácido indol butírico (AIB), em diferentes concentrações, não resultou no enraizamento das culturas, o que indicou a necessidade de aprimoramento desta fase da micropropagação. Os protocolos de indução de calos desenvolvidos para *T. roseoalba* permitiram alta frequência de indução a partir de cotilédones e hipocótilo somente quando utilizado o 2,4-D, e o mesmo resultado foi observado para *T. avellanae* também para segmentos de folhas, nós foliares e cotiledonares. Na ausência de 2,4-D uma pequena proporção dos explantes de *T. roseoalba* formaram calos e no caso de *T. avellanae* apenas segmentos de hipocótilos. Valores superiores de crescimento dos calos foram alcançados, para explantes de *T. avellanae* na concentração de 1,25 μM de 2,4-D, enquanto para *T. roseoalba* nas concentrações de 1,25 e 2,5 μM de 2,4-D. Nós cotiledonares de *T. avellanae* produziram calos com maior massa seca que nós foliares, tanto em 2,4-D como em ANA. Nas análises das características estruturais e ultraestruturais, as células formadoras dos calos em *T. avellanae* foram caracterizadas como indiferenciadas e mostraram grãos de amido como principal componente de reserva. Nas análises fitoquímicas dos calos de *T. avellanae* foram detectados compostos voláteis e possíveis precursores dos compostos identificados na planta adulta.

Palavras-chaves: *Tabebuia*, germinação, cultura *in vitro*.

ABSTRACT

Tabebuia avellanedae Lorentz ex Grisebach, *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand. And *Tabebuia pentaphylla* (Linnaeus) Hemsley are arboreal tropical species and belong to the family Bignoniaceae. These species provide environmental and economic benefits, assisting in the recovery of degraded areas and are important for their ornamental and medicinal uses (Lapachol extraction). These species propagate mainly by seeds, which present short period of viability according to storage conditions. Therefore, there is relative unavailability of seeds, and there is urgent need to develop efficient methods for propagation and germplasm conservation. In this study seeds of the species *T. roseoalba* and *T. pentaphylla* were submitted to storage temperatures of -196°C (liquid nitrogen), -20°C (freezer), 0°C, 5°C (refrigerator) and 25°C (room temperature) and the effects on germination, seed water content and seedling early growth were analyzed. Biotechnological techniques were also applied using the species *T. avellanedae* and *T. roseoalba* in order to test the effects of growth regulators on *in vitro* propagation and callus induction for studies of secondary metabolites. Seed viability of *T. roseoalba* decreased 14.4% in the fourth week of storage at room temperature in relation to refrigerator storage, but for *T. pentaphylla* the decrease in viability was detected only after 40 days storage. The water content of *T. roseoalba* seeds decreased from 8.4% to 6.6% after 10 months storage in refrigerator, followed by reduced viability and decline in the germination velocity index, on the contrary, seeds of *T. pentaphylla* suffered no drop in viability after 15 months storage, even with the water content reduction from 7.1% to 4.8%. The results obtained for cryopreservation of *T. roseoalba* and *T. pentaphylla* seeds confirmed the efficacy of this method as normal plants were produced from cryopreserved seeds. After cryopreservation the seeds of *T. roseoalba* were maintained at room temperature or refrigerator for one week and again cryopreserved, without losing viability, while for *T. pentaphylla* seeds were maintained for three weeks. For the establishment of *in vitro* culture systems, sodium hypochlorite was successfully used for seed disinfection and axenic seedling establishment. The standard MS medium was used as culture medium, ensuring satisfactory germination, seedling or explant establishment, maintenance and growth for *T. roseoalba* and *T. avellanedae*. At 50-52 days after seed inoculation, seedlings of *T. roseoalba* produced 1.83 leaf nodes/seedling while the seedlings of *T. avellanedae* 2.73 leaf nodes/seedling, all able to provide explants for the experiments with exogenous growth regulators. Efficient shoot culture systems of *T. avellanedae* were induced from apical nodes, leaf nodes and

cotyledonary nodes cultured with 2,5 μM BAP, and the best results were obtained with cotyledonary nodes. However, both BAP and kinetin were effective for *T. avellanedae* shoot culture establishment. Indole butyric acid (IBA) in different concentrations had no effect on shoot rooting, which indicated the need for improvement of this micropropagation stage. The protocols of callus induction developed for *T. roseoalba* allowed high frequency induction from cotyledon and hypocotyl only when using 2,4-D, and the same result was observed for *T. avellanedae* also for leaf segments and for leaf and cotyledonary nodes. In the absence of 2,4-D a small proportion of *T. roseoalba* explants formed callus and in the case of *T. avellanedae* only segments of hypocotyls. Higher values of callus dry mass were obtained for *T. avellanedae* explants with 1.25 μM 2,4-D, while for *T. roseoalba* the best concentrations were 1,25 e 2,5 μM 2,4-D. Cotyledonary nodes of *T. avellanedae* produced callus with higher dry mass than leaf nodes, both for 2,4-D and ANA. The callus structural and ultrastructural analysis showed that the forming cells in *T. avellanedae* were undifferentiated and having starch grains as the main reserve component. Phytochemical analysis of callus from *T. avellanedae* detected volatile compounds and possible precursors of the compounds identified in the bark extract of adult plant.

Keywords: *Tabebuia*, germination, *in vitro* culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Germinação de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i> armazenadas em freezer (FZ, -20°C), geladeira (GL, 5°C) ou nitrogênio líquido (NL, -196°C) durante 10 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).	35
Figura 2. Germinação de sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i> imersas em nitrogênio líquido (-196°C) por 1 hora e do controle. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).	39
Figura 3. Germinação de sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i> armazenadas em freezer (FZ, -20°C), geladeira (GEL, 5°C) e nitrogênio líquido (NL, -196°C) durante 15 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).	43
Figura 4. Germinação de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i> desinfetadas com hipoclorito de sódio por 15 ou 30 minutos e inoculadas em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).	45
Figura 5. Germinação de sementes de <i>Tabebuia avellanadae</i> , após diferentes períodos (15 e 30 minutos) de desinfecção em hipoclorito de sódio e inoculadas em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).	48
Figura 6. Fórmula do lapachol.	63
Figura 7. Eletroferograma do extrato hidroalcoólico de calos de <i>Tabebuia avelanadae</i>	63
Figura 8. Eletroferograma do extrato hidroalcoólico da casca de <i>Tabebuia avellanadae</i>	64
Figura 9. Cromatograma de íons totais dos constituintes voláteis de calos de <i>Tabebuia avellanadae</i> . S = fragmentos de siloxano desprendidos da fibra PDMS.	64
Figura 10. Espectros de massas dos constituintes voláteis identificados no cromatograma de íons totais da SPME de calos de <i>Tabebuia avellanadae</i> . Espectro A – espectro composto. Espectro B – provável composto fornecido pela biblioteca NIST	66

Figura 11. Caracterização citoquímica de calos jovens (20 dias) de *Tabebuia avellaneda* (8 meses). [A] Grupo de células coradas com ao AT-O com reação metacromática na parede celular.. [B] Detalhe de um agregado celular corado com AT-O Amiloplastos não corados (setas) [C] Células coradas com CBB mostrando núcleo com dois nucléolos. [D] Celulas PAS positivas com poucos amiloplastos (seta) e marcadas na parede celular para polissacarídeos neutros.68

Figura 12. Caracterização citoquímica de calos maduros (40 dias) de *Tabebuia avellaneda* (8 meses). [A] Grupo de células coradas com ao AT-O com reação metacromática na parede celular. [B] Detalhe de um agregado celular corado com AT-O com conteúdo citoplasmático ortocromático (seta) [C] Células PAS positivas na parede celular e em grãos de amido no citoplasma (seta). [D] Porção de um agregado celular com região superficial com citoplasma ortocromático e células alongadas (setas). [E] Grupo de células coradas com CBB mostrando núcleos grande com um ou dois nucléolos (seta). [F] Células com região nuclear parietal CBB positiva [seta].....69

Figura 13. Caracterização citoquímica de calos maduros (40 dias) de *Tabebuia avellaneda* (4 meses). [A] Grupo de células coradas com ao CBB com reação positiva para o citoplasma periférico e região nuclear. [B] Detalhe de um agregado celular corado com CBB com conteúdo citoplasmático positivo ao corante. [C] Células corados com AT-O com reação metacromática pouco evidente. Observe os núcleos com dois nucléolos (setas) [D] Células periféricas com formato retangular com reação PAS positiva para aparedo celular e para os grãos de amido [seta].....70

Figura 14. Aspectos ultraestruturais de calos jovens (20 dias) de *Tabebuia avellaneda* (8 meses). [A] Parede celular com cerca de 0,4 μm , presença de pró plastídio em citoplasma estreito. [B-C] Grande vacúolo, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias no citoplasma. [D] Paredes celulares de células justapostas, vesícula sendo secretada do citoplasma para o vacúolo. [E] Pequeno amiloplasto presente. [F] Visualização de corpo de Golgi. (pc)-parede celular, (pp)-próplastídio, (va)-vacúolo, (rer)-retículo endoplasmático rugoso, (mit)-mitocôndria, (vs)-vesícula, (ap)-amiloplasto, (cg)-corpo de Golgi.72

Figura 15. Aspectos ultraestruturais de células de calos maduros (40 dias) de *Tabebuia avellaneda* (8 meses). [A] Citoplasma periférico com presença de amiloplastos e núcleo ativo envolto por envelope nuclear. [B-C] Núcleo grande parietal por grande vacúolo, mitocôndrias perinucleares, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres. [D] Mitocôndrias observadas no delgado citoplasma. (E) Pequenos vacúolos presentes no citoplasma. [F] Citoplasma com amiloplastos e ribossomos livres. (nu)-núcleo, (en)-envelope

nuclear, (ap)-amiloplastos, (va)-vacúolo, (pc)-parede celular, (rer)-retículo endoplasmático rugoso, (mit)-mitocôndria.....73

Figura 16. Aspectos ultraestruturais de calos maduros (40 dias) de *Tabebuia avellaneda* (4 meses). [A-B] Núcleo grande, presença de mitocôndrias ao redor do envelope nuclear e presença de amiloplastos subdivididos. [C] Parede celular de células justapostas, vacúolos grandes e mitocôndrias visíveis. [D] Subdivisão de amiloplasto em detalhe, e corpos de Golgi indicados por setas. [E] Pequenos vacúolos presentes no citoplasma. [F] Numerosos fragmentos de RER e ribossomos livres. (nu)-núcleo, (va)-vacúolo, (ap)-amiloplastos, (rer)-retículo endoplasmático rugoso, (mit)-mitocôndria, (pc)-parede celular, (cg)-corpo de golgi.74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do armazenamento de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i> em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C), por períodos de 1 a 4 semanas, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.....	29
Tabela 2. Efeito do armazenamento de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i> em geladeira (5°C), por períodos de 6, 19 e 25 meses, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.	29
Tabela 3. Teor de água de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i> no momento da montagem dos experimentos de imersão em nitrogênio líquido (-196°C).	30
Tabela 4. Efeito da imersão em nitrogênio líquido (-196°C), por períodos de 30 minutos, 1 h e 24 h sobre a germinação máxima de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i> , alcançada 12 dias após o início do experimento.....	30
Tabela 5. Massa seca de órgãos, área foliar e razão raiz/parte aérea (R/PA) de plantas de <i>Tabebuia roseoalba</i> de 70 dias de idade, originadas a partir de sementes conservadas em geladeira por (controle) ou imersas em nitrogênio líquido (-196°C) por 1h, seguido de descongelamento lento.	31
Tabela 6. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de <i>Tabebuia roseoalba</i> em temperatura ambiente (25°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda imersão em nitrogênio líquido (-196°C), sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.	32
Tabela 7. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de <i>Tabebuia roseoalba</i> em geladeira (5°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.	32
Tabela 8. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de <i>Tabebuia roseoalba</i> em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.	33
Tabela 9. Teor de água de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i> armazenadas em geladeira (5°C) e temperatura ambiente (25°C) por 10 meses.....	34

Tabela 10. Altura e valores de massa seca de plantas de <i>Tabebuia roseoalba</i> de 30 e 60 dias de idade, originadas a partir de sementes armazenadas por 10 meses em freezer (-20°C), geladeira (5°C) ou nitrogênio líquido (-196°C).....	35
Tabela 11. Efeito do armazenamento de sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i> em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C), por períodos de 1 a 4 semanas, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.....	36
Tabela 12. Efeito do armazenamento de sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i> em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C), por períodos de 40 dias a 3 meses, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.....	37
Tabela 13. Efeito do armazenamento de sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i> em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C), por períodos de 3 a 15 meses, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.	37
Tabela 14. Teor de água de sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i> no momento de montagem do experimento (controle) e após armazenamento por 3, 6 e 15 meses em geladeira (5°C).....	38
Tabela 15. Teor de água de sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i> no momento de montagem do experimento de imersão em nitrogênio líquido (-196°C).....	38
Tabela 16. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de <i>Tabebuia pentaphylla</i> em temperatura ambiente (25°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.	40
Tabela 17. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de <i>Tabebuia pentaphylla</i> em geladeira (5°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.	41
Tabela 18. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de <i>Tabebuia pentaphylla</i> em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.	41
Tabela 19. Teor de água de sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i> no momento de montagem do experimento (controle) e após armazenamento por 15 meses em geladeira (5°C) ou temperatura ambiente (25°C).	42
Tabela 20. Taxas máximas de germinação de sementes de <i>Tabebuia.pentaphylla</i> armazenadas em diferentes condições por 3, 6, 13 e 15 meses.	44

Tabela 21. Altura e valores de massa seca e massa fresca de plantas de <i>Tabebuia pentaphylla</i> de 30 dias de idade, originadas a partir de sementes armazenadas por 15 meses em freezer (-20°C), geladeira (5°C) e nitrogênio líquido (-196°C).	44
Tabela 22. Número de nós foliares produzidos por plântulas de <i>Tabebuia roseoalba</i> germinadas e mantidas em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, por diferentes períodos de cultivo.	46
Tabela 23. Efeito do 2,4-D sobre a morfogênese <i>in vitro</i> em diferentes tipos de explantes de plântulas de <i>Tabebuia roseoalba</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 7 semanas de cultivo.	47
Tabela 24. Efeito do 2,4-D sobre as massas fresca e seca e sobre o teor de água de calos obtidos a partir de segmentos de cotilédone e hipocótilo de plântulas de <i>Tabebuia roseoalba</i> cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 7 semanas de cultivo.	47
Tabela 25. Número de nós foliares produzidos por plântulas de <i>Tabebuia avellanedae</i> germinadas e mantidas em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, por diferentes períodos de cultivo.	49
Tabela 26. Efeito do BAP sobre a morfogênese de diferentes explantes de plântulas de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 8 semanas.	49
Tabela 27. Efeito do BAP sobre o crescimento de culturas de ramos a partir de explantes de plântulas de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 8 semanas.	50
Tabela 28. Efeito do BAP e cinetina sobre a morfogênese de diferentes explantes de plântulas de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 8 semanas.	51
Tabela 29. Efeito do BAP e cinetina sobre o crescimento de cultura de ramos a partir de diferentes explantes de plântulas de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 8 semanas.	52
Tabela 30. Efeito de auxinas sobre a morfogênese <i>in vitro</i> de nós foliares e cotiledonares de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.	54

Tabela 31. Efeito do 2,4-D sobre a massa seca e o teor de água de calos obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.	54
Tabela 32. Efeito do 2,4-D sobre a massa fresca de calos (mg) obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.....	55
Tabela 33. Efeito do ANA sobre o crescimento de calos obtidos a partir de cultura de nós foliares e cotiledonares de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.....	56
Tabela 34. Efeito do AIB sobre o teor de água de calos obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.	57
Tabela 35. Efeito do AIB sobre as massas fresca e seca de calos obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.....	58
Tabela 36. Efeito de auxinas sobre a distribuição de frequência (%) de classes de intervalos de massa seca de calos obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.	59
Tabela 37. Efeito do 2,4-D sobre a morfogênese <i>in vitro</i> em diferentes tipos de explantes de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.	60
Tabela 38. Efeito do 2,4-D sobre o crescimento de calos obtidos a partir da cultura de diferentes tipos de explantes de <i>Tabebuia avellanedae</i> cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.....	61
Tabela 39. Efeito do 2,4-D sobre a distribuição por frequência (%) de classes de intervalos de massa seca de calos obtidos a partir de cultura de diferentes tipos de explantes de <i>Tabebuia</i>	

avellanae, originadas em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo. 62

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

AIA – Ácido indol-3-acético

AIB – Ácido indol-3-butírico

ANA – Ácido Naftalenoacético

ANOVA – Análise de variância

BAP – 6-Benzilaminopurina

CIN – 6-Furfurilaminopurina (cinetina)

CBB – Azul brilhante de Coomassie

HCl – Ácido clorídrico

IVG – Índice de velocidade de germinação

L – Litro

M – Molar

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MF – Matéria fresca

mg – Miligrama

ml - Mililitro

mm – Milímetro

MS – Matéria seca

MS – Meio de cultura basal estabelecido por Murashige e Skoog (1962)

MO – Microscopia Ótica

NaOH – Hidróxido de sódio

NC – Nó cotiledonar

NL – Criopreservado

NF – Nó foliar

PAS – Ácido Periódico de Shiff

TOL – Azul de Toluidina

µm – Micrometro

µM – Micromol

SUMÁRIO

RESUMO	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 FAMÍLIA BIGNONIACEAE E O GÊNERO <i>TABEBUIA</i>	3
2.1.1 <i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Grisebach	5
2.1.2 <i>Tabebuia roseoalba</i> (Ridl.) Sandwith	7
2.1.3 <i>Tabebuia pentaphylla</i> (Linnaeus) Hemsley	8
2.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E CULTURA <i>IN VITRO</i> DE ESPÉCIES NATIVAS BRASILEIRAS	9
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE <i>TABEBUIA ROSEOALBA</i> E <i>TABEBUIA PENTAPHYLLA</i>	15
4.1.1 Material Vegetal	15
4.1.2 Determinação do teor de água das sementes.....	15
4.1.3 Condições de armazenamento	15
4.1.4 Germinação das sementes	16
4.1.5 Índice de velocidade de germinação	16
4.1.6 Crescimento das plântulas	17
4.1.7 Determinação da área foliar e massa seca.....	17
4.1.8 Análise Estatística.....	17
4.2 CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>TABEBUIA ROSEOALBA</i> E <i>TABEBUIA AVELLANEDAE</i>	18
4.2.1 Material Vegetal	18
4.2.2 Desinfecção das sementes.....	18
4.2.3 Preparação dos meios de cultura	18
4.2.4. Estabelecimento de plântulas axênicas e condições de crescimento das culturas ..	19

4.2.5 Efeito de reguladores de crescimento sobre a micropropagação	19
4.2.6 Efeito de auxinas sobre o crescimento dos calos	19
4.2.7 Efeito de tipos de explantes sobre o crescimento de calos	20
4.2.8 Determinação da massa seca e do teor de água de calos	20
4.2.9 Análise Estatística.....	21
4.3 ANÁLISES EM MICROSCOPIA ÓTICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	21
4.3.1 Cultura e processamento do material biológico.....	22
4.3.2 Condições de cultivo das amostras.....	22
4.3.3 Microscopia ótica (MO)	22
4.3.4 Testes citoquímicos	23
4.3.4.1 Observação de proteínas totais	23
4.3.4.2 Polissacarídeos ácidos	24
4.3.4.3 Polissacarídeos neutros.....	24
4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	24
4.4 ANÁLISES FITOQUÍMICAS DE CALOS DE <i>TABEBUIA AVELLANEDAE</i>	26
4.4.1 Material Vegetal	26
4.4.2 Análise por eletroforese capilar do extrato hidroalcoólico de calos de <i>Tabebuia avellanedae</i>	26
4.4.3 Análise por CGAR-EM dos constituintes voláteis de calos de <i>Tabebuia avelanedae</i>	26
5 RESULTADOS	28
5.1 GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE <i>TABEBUIA ROSEOALBA</i> E <i>TABEBUIA PENTAPHYLLA</i>	28
5.1.1 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) sobre a viabilidade das sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i>	28
5.1.2 Efeito da imersão em nitrogênio líquido (-196°C) sobre o teor de água, a viabilidade das sementes e o crescimento inicial das plantas de <i>Tabebuia roseoalba</i>	29
5.1.3 Efeito da segunda imersão em nitrogênio líquido (-196°C) sobre a viabilidade das sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i>	31
5.1.3.1 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C)	31
5.1.3.2 Efeito do armazenamento em geladeira (5°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C).....	32

5.1.3.3 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C).....	33
5.1.4 Efeito do armazenamento por 10 meses em freezer (-20°C), geladeira (5°C), congelador (0°C) ou nitrogênio líquido (-196°C) sobre o teor de água, a viabilidade das sementes e o crescimento inicial das plantas de <i>Tabebuia roseoalba</i>	33
5.1.5 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) sobre a viabilidade das sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i>	36
5.1.6 Efeito da imersão em nitrogênio líquido (-196°C) sobre o teor de água e a viabilidade das sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i>	38
5.1.7 Efeito da segunda imersão em nitrogênio líquido (-196°C) sobre a viabilidade das sementes de <i>Tabebuia pentaphylla</i>	39
5.1.7.1 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C).....	39
5.1.7.2 Efeito do armazenamento em geladeira (5°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C).....	40
5.1.7.3 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C).....	41
5.1.8 Efeito do armazenamento por 15 meses em freezer (-20°C), geladeira (5°C), congelador (0°C) ou nitrogênio líquido (-196°C) sobre o teor de água, a viabilidade das sementes e o crescimento inicial das plantas de <i>Tabebuia pentaphylla</i>	42
5.1.9 Efeito de armazenamento em freezer (-20°C), geladeira (5°C), congelador (0°C) ou nitrogênio líquido (-196°C) por 3, 6, 13 e 15 meses sobre a viabilidade das sementes e o crescimento inicial das plantas de <i>Tabebuia pentaphylla</i>	43
5.2 CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>TABEBUIA ROSEOALBA</i> E <i>TABEBUIA AVELLANEDAE</i>	44
5.2.1 <i>Tabebuia roseoalba</i>.....	44
5.2.1.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Tabebuia roseoalba</i>	44
5.2.1.2 Análise de crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Tabebuia roseoalba</i>	45
5.2.1.3 Indução e crescimento de calos de <i>T. roseoalba</i>	46
5.2.2 <i>Tabebuia avellanadae</i>	47
5.2.2.1 Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Tabebuia avellanadae</i>	47
5.2.2.2 Análise de crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Tabebuia avellanadae</i>	48
5.2.2.3 Efeito de citocininas sobre a iniciação de culturas de ramos de <i>Tabebuia avellanadae</i>	49
5.2.2.4 Indução e crescimento de calos de <i>Tabebuia avellanadae</i>	52

5.2.2.4.1 Efeito de auxinas e tipos de explante sobre a indução e o crescimento dos calos de <i>Tabebuia avellanedae</i>	52
5.2.2.4.2 Efeito de tipos de explantes e 2,4-D sobre o crescimento de calos de <i>Tabebuia avellanedae</i>	59
5.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA DE CALOS DE <i>TABEBUIA AVELLANEDAE</i>	62
5.3.1 Análise dos constituintes do extrato hidroalcoólico de calos de <i>Tabebuia avellanedae</i>.....	62
5.4.2 Análise dos constituintes voláteis de calos de <i>Tabebuia avellanedae</i>.....	64
5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DE CALOS.....	66
6 DISCUSSÃO	75
6.1 GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE <i>TABEBUIA ROSEOALBA</i> E <i>TABEBUIA PENTAPHYLLA</i>	75
6.2 CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>TABEBUIA ROSEOALBA</i> E <i>TABEBUIA AVELLANEDAE</i>	82
6.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA DE CALOS DE <i>TABEBUIA AVELLANEDAE</i>	88
6.4 ANÁLISES DOS CALOS DE <i>TABEBUIA AVELLANEDAE</i> EM MO E MET	90
7. CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1 INTRODUÇÃO

Os seis maiores biomas do Brasil, Amazônia, Mata Atlântica, Pantanal, Cerrado, Caatinga e Pampa compreendem 20% da biodiversidade mundial (BRASIL, 2010). A Amazônia e Pantanal são os biomas mais preservados (82-83% das áreas originais) seguidos pelos Cerrado, Caatinga e Pampa (41-45% das áreas originais) e pela Mata Atlântica (7.26% da área original) (PILATTI *et al.*, 2010). Em 2005 o Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) e a Fundação Biodiversitas revisaram a lista das espécies nativas brasileiras ameaçadas de extinção e em 2008 uma nova lista foi publicada (BRASIL, 2008) em que 472 espécies foram consideradas em extinção entre as 1495 espécies propostas pela Fundação Biodiversitas (BIODIVERSITAS, 2005). Entretanto, é pequeno o número de espécies florestais brasileiras nativas para as quais são definidos programas de conservação, devido ao pouco conhecimento sobre a ecologia e reprodução vegetativa, que acaba gerando entraves quanto à regeneração artificial. A regeneração natural e a disponibilidade de plântulas para programas de reflorestamento sofrem efeitos de fatores bióticos como crescimento lento de várias espécies, suscetibilidade à patógenos, floração esporádica, baixa viabilidade e qualidade das sementes (VIANA *et al.*, 1999). A criopreservação de sementes é uma abordagem para a conservação *ex situ*, que apresenta vantagens para a conservação em longo prazo das espécies tropicais e subtropicais e mesmo no caso das espécies com sementes ortodoxas e intermediárias, o armazenamento das sementes a -20°C, em bancos de germoplasma, por longos períodos, pode levar a danos fisiológicos e genéticos (STANWOOD e ROSS, 1979; STANWOOD E BASS, 1981). Portanto, a criopreservação de sementes é uma forma eficiente de conservar a biodiversidade das espécies florestais das regiões subtropicais e tropicais (WETZEL, 2003).

Para que sejam estabelecidas estratégias de conservação, é necessário que informações sobre a biologia reprodutiva e ecologia destas espécies se associem a estudos sobre a variabilidade genética e marcadores moleculares (VIANA *et al.*, 1999). Esses autores enfatizam a crescente demanda por dados sobre sistemas de cultura de embriões zigóticos, embriogênese somática, cultura de calos, suspensões celulares, micropropagação e biotecnologia da conservação que aliados à caracterização da estrutura genética das populações de espécies florestais brasileiras proverão fundamentos para complementar as abordagens tradicionais, possibilitando a conservação *ex situ* sustentável de germoplasma de espécies nativas a curto, médio e longo prazo. Assim, a biotecnologia de espécies florestais

permite que novas abordagens sejam utilizadas para o resgate e conservação de germoplasma das espécies, além de permitir o desenvolvimento de sistemas de regeneração de plantas a partir de calos, para a transformação genética, clonagem rápida e em massa de genótipos selecionados e a produção de metabólitos secundários a partir de culturas de células e/ou tecidos (HAINES, 1994).

As espécies *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Grisebach, *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand., e *Tabebuia pentaphylla* (Linnaeus) Hemsley apresentam considerada importância na recuperação de áreas degradadas, com características de grande potencial madeireiro, ornamental, medicinal e ecológico. O potencial medicinal do gênero *Tabebuia* é destacado pela produção do lapachol, um produto natural de fácil extração da serragem da madeira de várias espécies de ipês (SILVA, M. *et al.*, 2003). Este composto natural quimicamente identificado como uma naftoquinona tem reconhecida ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária, antitripanossoma, e anti-neoplásica (ARAÚJO *et al.*, 2002). Poucos estudos sobre a conservação de sementes, micropropagação, cultura de calos e avaliação do potencial de produção de metabólitos secundários por processos biotecnológicos estão disponíveis na literatura. Estudos mais aprofundados são necessários para assegurar a conservação de germoplasma e a produção de biomassa para as pesquisas sobre os metabólitos secundários de interesse. Assim, o desenvolvimento de protocolos eficientes de conservação de sementes e a aplicação de técnicas de cultura e conservação *in vitro* possibilitarão a produção eficiente de mudas, a conservação de recursos genéticos vegetais em longo prazo, além de tornar disponíveis sistemas de micropropagação e de culturas de calos e de raízes para estudos futuros sobre os metabólitos secundários.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA BIGNONIACEAE E O GÊNERO *TABEBUIA*

A família Bignoniaceae compreende aproximadamente 800 espécies distribuídas em 112 gêneros (SPANGLER e OLMSTEAD, 1999). Esta família tem distribuição pantropical, e no Brasil ocorrem cerca de 50 gêneros e 350 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). O Brasil é considerado o centro da diversidade de Bignoniáceas, pois, no país, ocorrem cerca de 60 gêneros e, aproximadamente, 338 espécies distribuídas desde os cerrados até florestas úmidas, incluindo os táxons endêmicos (GENTRY, 1980). São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas e também trepadeiras (JOLY, 2002).

Segundo APG (2003) esta família está inserida em Lamiales sendo proximamente relacionada a Acanthaceae. As características morfológicas mais comuns são a presença de gavinhas, filotaxia com folhas opostas, raramente verticiladas ou alternas, em geral com folhas compostas e sem estípulas. As inflorescências podem ser de formas diversas, como cimosas ou racemosas, porém se apresentam mais frequentemente na forma paniculada. Suas flores são vistosas, bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas com cálice e corola pentâmeros, gamossépalo, com prefloração imbricada. Estames geralmente quatro, didínamos, epipétalos, anteras rimosas. Podem ainda existir estaminódios e discos nectaríferos estão geralmente presentes. O ovário é súpero, bicarpelar, bilocular raramente unilocular, com placentação axial ou raramente parietal, placenta bipartida, geralmente pluriovulado. O fruto é uma cápsula septicida ou loculicida, raramente baya, as sementes em geral são aladas (SOUZA e LORENZI, 2005).

O gênero *Tabebuia* compreende cerca de 100 espécies, originárias da América tropical, sendo muito comuns no Brasil (REITZ, 1974). É o maior gênero da família Bignoniaceae, distribuído a partir do sudoeste dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Chile. Ao longo de sua história taxonômica, pesquisadores interpretaram a diversidade morfológica de diferentes maneiras, e este gênero foi dividido e remontado várias vezes. A ampla diversidade morfológica sugere que pode haver mais de uma linhagem incluída dentro do conceito tradicional de *Tabebuia*. Recentes estudos moleculares com *Tabebuia* mostraram ser um grupo polifilético, necessitando revisão taxonômica (GROSE e OLMSTEAD, 2007).

As espécies do gênero *Tabebuia* têm sido utilizadas com propósitos madeireiros, de restauração de áreas devastadas, bem como para fins medicinais; mas, apesar da importância dessas espécies no contexto nacional, o alto grau de desmatamento tem levado à diminuição das populações (OLIVEIRA *et al.*, 2005). As espécies de *Tabebuia* são conhecidas popularmente como ipê (LORENZI, 1992). Estas podem ser agrupadas, de acordo com a cor da flor que produzem, em: amarela, branca, roxa ou rosa (MAEDA e MATTHES, 1984). A flor-símbolo do Brasil é a do ipê-amarelo, amplamente utilizado em projetos de paisagismo, esta árvore produz madeira de excelente qualidade (MARQUES, 2004). De acordo com Silva *et al.* (2003) pode ser extraído da serragem da madeira o lapachol, que dentre as naftoquinonas naturais é considerado um dos principais representantes do grupo das quinonas principalmente encontradas no gênero *Tabebuia*. O lapachol possui atividade comprovada como anti-inflamatória, antiúlcera gástrica, antineoplásica e antimicrobiana (ALMEIDA *et al.*, 1990; FAVARO *et al.*, 1990; GOEL *et al.*, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Os ipês produzem um grande número de sementes leves e aladas, de curta longevidade natural vinculada às baixas quantidades de substâncias de reserva contidas nas sementes (KAGEYAMA e MARQUEZ, 1981). De acordo com Bittencourt Júnior (2003), algumas espécies do gênero *Tabebuia* são auto - incompatíveis, e esta auto-incompatibilidade se expressa por uma baixa produtividade de frutos e sementes em autopolinizações, quando comparado ao número de sementes e frutos formados por polinizações cruzadas. As sementes de ipê germinam logo após a sementeira e algumas espécies suportam transplante já na fase adulta podendo este ser realizado durante a fase de perda de folhas (POTT e POTT, 2003).

Segundo Grose e Olmstead (2007) as espécies de *Tabebuia*, caracterizadas por ter madeira extremamente densa contendo copiosas quantidades de lapachol, foram colocadas no gênero *Handroanthus*. Portanto, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos é o nome proposto em um dos rearranjos taxonômicos para a espécie *Tabebuia avellanae* Lorentz ex Grisebach. No entanto, no presente estudo foi empregado o nome *Tabebuia avellanae* por ser mais comum na literatura científica. As espécies pesquisadas neste trabalho são descritas a seguir.

2.1.1 *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Grisebach

A espécie *Tabebuia avellanedae* é popularmente conhecida no Brasil como ipê-roxo. Ocorre naturalmente no sul e oeste da Bahia, no Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e no nordeste da Argentina, sul da Bolívia, leste do Paraguai e Uruguai (CARVALHO, 1994). As árvores desta espécie ocupam, na mata primária, o dossel superior, possuem copa arredondada e a altura varia de 20 a 35m. As folhas são compostas palmadas e as inflorescências em forma globosa, com flores geralmente em grupos de três. Possuem fruto do tipo cápsula alongada e sementes aladas. Em relação à ornamentação e paisagística é a espécie de ipê roxo mais largamente utilizada (LORENZI, 1998). Isto principalmente devido à cor rósea das flores e à beleza de sua floração, que aparece desde o segundo ano de vida, mesmo antes de atingir 1m de altura (PINTO *et al.*, 1988).

É uma espécie de grande valor comercial, uma vez que sua madeira é considerada de boa qualidade e é largamente empregada na carpintaria, marcenaria e construção naval. São plantas resistentes ao replantio apresentando uma alta porcentagem de estabelecimento; desenvolvem-se bem em campo aberto e produzem grande quantidade de sementes férteis (REITZ *et al.*, 1979).

O início da deiscência e a mudança mais acentuada de coloração dos frutos mostraram-se como bons indicadores do ponto de colheita de sementes do ipê-roxo (GEMAQUE *et al.*, 2002). A taxa de germinação das sementes de *Tabebuia avellanedae* geralmente está em torno de 80%, contudo, quando armazenadas, a viabilidade das sementes não ultrapassa 90 dias e a germinação ocorre entre 6 e 12 dias após a sementeira (LORENZI, 1998).

A espécie *Tabebuia avellanedae* é recomendada para a utilização em recuperação de áreas degradadas em estágio inicial e médio de recuperação. Essa planta se desenvolve bem em floresta estacional decidual tanto para áreas de encosta como para áreas de mata ciliar (GLUFKE, 1999). *Tabebuia avellanedae* ocorre naturalmente em vários tipos de solos, desde solos planos a pouco ondulados, bem como nos solos pedregosos ou onde a drenagem das águas é bastante lenta. É considerada uma espécie de sol e seletiva higrófila, comum na vegetação secundária (REITZ, 1974).

Em experimentos realizados por Engel e Poggiani (1990), a espécie *Tabebuia avellanedae* revelou-se favorecida por níveis de sombra de 41 a 82%, mostrando uma

plasticidade morfológica bastante grande em resposta ao sombreamento. Esta espécie possui um crescimento satisfatório em pleno sol, mas é capaz de um rápido desenvolvimento, quando exposta a um grau de sombreamento de até 68%. Tais características mostram que a espécie possui uma estratégia de alocação rápida de assimilados para a parte aérea quando sombreada, o que lhe permite vencer a vegetação concorrente e expor de maneira mais favorável sua superfície fotossintetizante à luz. Em condições naturais esta espécie se beneficia das clareiras pequenas no dossel. Para a produção de mudas desta espécie, o sombreamento mostra-se bastante favorável, conseguindo-se mudas de melhor qualidade. Pode-se considerar que as mudas produzidas sob sombra terão melhores chances de sucesso mesmo sob pleno sol. É considerada por Soares *et al.*, (2003) como uma espécie secundária tardia na sucessão florestal. Devido à importância medicinal e à destruição da Mata Atlântica, seu principal local de ocorrência, esta espécie já esteve sob o risco de extinção (BORDIGNON e MENTZ, 1999). A regeneração desta espécie é, portanto, importante tanto do ponto de vista econômico, quanto do ecológico (MORATELLI, 2006).

Tabebuia avellanedae apresenta grande valor medicinal e seu uso na medicina tradicional ocorre desde a Era Inca (HASHIMOTO, 1962 apud YAMASHITA *et al.*, 2009). Pode ser extraído do ipê-rôxo o lapachol, um produto natural e quimicamente identificado como uma naftoquinona, de reconhecida ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária, antitripanossoma, e antineoplásica (ARAÚJO *et al.*, 2002). Podem ser encontrados na literatura trabalhos descrevendo o potencial desta espécie para produção de compostos bioativos. Possui ação antiproliferativa *in vitro* e quimiopreventiva do câncer, e atividade antimicrobiana relativamente forte contra bactérias gram-positivas e fungos (YAMASHITA *et al.*, 2009). Atua como remédio para várias doenças inflamatórias, tais como artrite e arteriosclerose (BYEON *et al.*, 2008). Inibe a proliferação do *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas (SILVA, 2006; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2008). É um biocida solúvel, de forte atividade esterilizante contra *Mycobacterium tuberculosis* (TRAN *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2009). Apresenta efeito larvicida contra o mosquito transmissor da dengue *Aedes aegypti* e contra o molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (RIBEIRO *et al.*, 2009). Contra células cancerosas (KUMAR *et al.*, 2009; EYONG *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2008).

2.1.2 *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith

A espécie *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand. popularmente é denominada de ipê-branco ou ipê-do-cerrado, apresenta porte variando de 7 - 16 m de altura, com tronco de 40 - 60 cm de diâmetro, e casca suberosa, superficialmente fissurada. Suas folhas são compostas trifolioladas, com folíolos levemente pubescentes em ambas as faces. É uma árvore de uso paisagístico devido à exuberância de suas flores brancas e folhagem de densa coloração verde. Seu florescimento ocorre nos meses de agosto a outubro e seus frutos amadurecem nos primórdios de outubro, com ampla produção de sementes, que são disseminadas pelo vento com facilidade (LORENZI, 1992).

Na América Latina *Tabebuia roseoalba* tem ocorrência na Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru e Paraguai. Especificamente no Brasil ocorre na floresta latifoliada semidecídua ao norte dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás. Esta espécie é também utilizada em reflorestamentos devido à capacidade de adaptação a terrenos secos e pedregosos. Sua madeira é moderadamente pesada, macia, lustrosa e de excelente durabilidade e é usada na construção civil para acabamentos internos (LORENZI, 1992).

Em função de sua adaptação a terrenos secos e pedregosos, *Tabebuia roseoalba* é muito útil para reflorestamentos neste tipo de ambiente, destinados à recomposição da vegetação arbórea. Ocorre tanto no interior da mata primária como nas formações secundárias. *Tabebuia roseoalba* é uma planta decídua, heliófita, seletiva xerófita, característica de afloramentos rochosos e calcários da floresta semidecídua. É esparsamente encontrada na caatinga do nordeste brasileiro e particularmente frequente nos terrenos com cascalhos nas margens do pantanal Mato-grossense (LORENZI, 1992).

No ipê-branco, a particularidade quanto à morfologia em relação às demais espécies do gênero, restringe-se à presença de pêlos glandulares em forma de anelídeo. Esta espécie tem como características cotilédones hipostomáticos e epiderme unisseriada, simples, cuticularizada e pilosa. Apresenta tricomas glandulares ou tectores que estão presentes tanto epiderme inferior, quanto na superior. Possui mesófilo cotiledonar heterogêneo, constituído de uma camada de parênquima paliçádico, voltado para epiderme superior e várias camadas de parênquima lacunoso, voltado para a epiderme inferior. A raiz apresenta epiderme simples, unisseriada, cuticularizada contendo tricomas glandulares. Os elementos traqueais dispõem-se em forma de anel ao redor de uma medula parenquimática. O

córtex também é parenquimático. Os pêlos absorventes não ocorrem em regiões próximas ao ápice radicular (ORTOLANI, 2007).

Dentre as espécies de ipês cultivadas, *Tabebuia roseoalba* é a única que produz flores brancas (MAEDA e MATTHES, 1984). Produz sementes com baixa viabilidade, com pequena porcentagem de germinação (40%) e estas perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas, mantendo-se por cerca de quatro meses (ABBADE, 2008; PORTO, 2009). *Tabebuia roseo-alba* foi a espécie que apresentou maior velocidade e índice de sincronização da germinação na temperatura de 25°C, dentre outras espécies de mesmo gênero estudadas (SANTOS, D., 2005). De acordo com Ortolani (2007), as sementes de *Tabebuia roseoalba* iniciam a germinação no quarto dia e não apresentam poliembrião. São sementes cordiformes, com leve assimetria nas alas e diâmetro médio de 2,284 cm ± 0,311 com alas e 0,923 cm ± 0,167 sem alas. O sistema radicular é axial e ramificado.

O ipê-branco é uma árvore semidecídua, que floresce abundantemente. Valiosa pela qualidade de sua madeira, bem como por sua capacidade de ornamentação, esta espécie tem sido largamente utilizada em reflorestamentos e arborização urbana. A fragmentação florestal reduz o tamanho da população reprodutiva, a densidade populacional e pode isolar populações e indivíduos em campos e pastagens. Dessa forma, entender seus efeitos é fundamental providenciar recomendações para conservação *in situ* e *ex situ* de espécies florestais (FERES, 2009).

2.1.3 *Tabebuia pentaphylla* (Linnaeus) Hemsley

A espécie *Tabebuia pentaphylla*, conhecida popularmente como ipê-rosa é originária de El Salvador. Esta espécie é semidecídua e atinge altura de 25 a 30 m. Apresenta tronco robusto, com casca levemente fissurada longitudinalmente. Tem ramagem longa, formando copa alongada formada por folhas compostas digitadas, de pecíolos longos, opostas, com cinco folíolos verde-escuros e rígidos, sendo o central maior, de ápice alongado, de doze à dezoito centímetros de comprimento. As inflorescências terminais são densas, em panículas volumosas, com flores campanuladas com cinco recortes, de colorido variável, desde quase branco à rosa claro ou rosa escuro, formadas de agosto à outubro. Seus frutos têm forma de cápsulas mais ou menos cilíndricas, deiscentes, com sementes aladas numerosas. (LORENZI

et al., 2003). A taxa de germinação das sementes de *Tabebuia pentaphylla* geralmente está em torno de 100%, e não germinaram a partir de 427 dias após a coleta (SILVA *et al.*, 2001).

A espécie *Tabebuia pentaphylla* tem sua distribuição natural desde o sudeste do México até a Venezuela e costa do Equador, ocorre em diversas formações florestais, é amplamente cultivada desde o nível do mar até altitudes de 1.200 m. Apresenta como sinônimas *Tecoma rosea* Bertoloni, *Tecoma mexicana* Martius ex A.P. de Candolle, *Tabebuia rosea* (Bertoloni) A.P. de Candolle, *Couralia rosea* (Bertoloni) Donnell Smith, *Tecoma punctatissima* Kränzlin e *Tabebuia punctatissima* (Kränzlin) Standley (GENTRY, 1992 apud SOCOLOWSKI e TAKAKI, 2007).

Socolowski e Takaki, (2007) em estudos sobre a germinação de sementes e emergência de plântulas de *Tabebuia rosea*, caracterizaram como uma espécie exótica de potencial invasor. Estes autores enfatizam a necessidade de um maior controle na distribuição e venda de mudas, com a finalidade de evitar os problemas de uma possível invasão da flora brasileira por essa espécie, e para a urgência de estudos sobre a ocorrência espontânea da espécie em ambientes naturais.

No Brasil é utilizada na arborização de parques, ruas e avenidas devido ao seu florescimento intenso, rusticidade e rápido crescimento (LORENZI *et al.*, 2003). Na Venezuela de acordo com Vit (2004), é uma das espécies amplamente utilizadas como recurso madeireiro, ornamental e de interesse apícola (visitada por numerosas espécies de abelhas para obtenção de néctar e pólen).

2.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES E CULTURA *IN VITRO* DE ESPÉCIES NATIVAS BRASILEIRAS

De acordo com Pilatti *et al.* (2010) o desenvolvimento de protocolos de criopreservação para as espécies nativas brasileiras é limitada e concentra-se nas espécies de importância econômica. Os trabalhos com as espécies ameaçadas de extinção encontram barreiras devido à recalcitrância das sementes, limitação da disponibilidade de sementes e ausência de conhecimento sobre o comportamento das sementes durante o armazenamento. Segundo esses autores estudos sobre criopreservação com espécies de sementes intermediárias foram conduzidos para espécies das famílias Rubiaceae e Palmae. Para as espécies com sementes ortodoxas vários estudos foram conduzidos como descrito a seguir.

Medeiros e Cavallari (1992) desidrataram as sementes ortodoxas de *Astronium urundeuva* a 25°C e 10-15% de umidade relativa por 24 h, 48, 72, 96 e 120 h antes da imersão em nitrogênio líquido por 15 dias seguida de descongelamento em temperatura ambiente. As sementes sobreviveram à criopreservação mesmo sem serem desidratadas (teor de água de 8,01%) mas os melhores resultados foram obtidos após desidratação por 24, 72 e 96 h quando foram alcançados teores de umidade de 7,13, 5,89 e 5,96%.

Salomão (2002) estudou a tolerância à criopreservação de sementes ortodoxas de 66 espécies nativas do Cerrado e da Mata Atlântica demonstrando a eficiência da criopreservação como alternativa em relação à conservação à -20°C. Este autor analisou espécies das famílias Anacardiaceae, Apocynaceae, Bombacaceae, Bignoniaceae, Caesalpinoideae, Combretaceae, Dioscoreaceae, Fabaceae, Guttiferae, Lecythidaceae, Litraceae, Malpighiaceae, Meliaceae, Mimosaceae, Rubiaceae, Sapindaceae, Sterculiaceae, Styracaceae, Papilionoideae, Proteaceae, Verbenaceae e Tiliaceae. As sementes não foram desidratadas antes da imersão por 3 dias em nitrogênio líquido e o descongelamento foi realizado em temperatura ambiente (25°C) por 3 horas. O teor de umidade das sementes variou entre 3 e 15% da massa fresca. Todas as espécies toleraram o armazenamento criogênico sendo que a sensibilidade ao nitrogênio líquido variou entre as espécies, Em certos casos a viabilidade foi reduzida como em *Dimorphandra mollis*, *Bauhinia acuruana*, *Bauhinia unguulate*, *Dalbergia miscolobium*, *Sterculia striata*, *Styrax camporum*. Em outros casos a viabilidade aumentou como em *Schinopsis brasiliensis*, *Spondias mombin*, *Bowdichia virgilioides*, *Pterodon emarginatus*, *Mimosa somnians* var. *viscida*, *Stryphnodendron polyphyllum*, *Apeiba tibourbou*, *Crotalaria* cf. *spectabilis*, *Cariniana strellensis*. As espécies de Bignoniaceae estudadas por Salomão (2002) foram *Anemopaegma arvense*, *Jacarandá cuspidifolium*, *Jacarandá decurrens*, *Tabebuia áurea*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tabebuia roseo-alba*, *Tabebuia serratifolia*, *Zeyeria montana*.

Os estudos sobre a criopreservação de espécies nativas brasileiras com sementes ortodoxas conduzidos por Wetzl *et al.* (2003), foram realizados com sementes de 13 espécies do Cerrado. As famílias estudadas foram Bombacaceae, Bignoniaceae, Caesalpinoideae, Fabaceae, Mimosaceae, Papilionoideae, Proteaceae, Verbenaceae e Vochysiaceae. Estes autores observaram que o teor de umidade das sementes variou de 5,41% (*Mimosa setosa*) a 25,17% (*Qualea parviflora*). Após a secagem por 15 dias a 20±3°C e 12±3% de umidade relativa o teor de água das sementes variou de 3,46% (*Mimosa setosa*) a 8,46% (*Qualea parviflora*). As sementes permaneceram 7 dias em nitrogênio líquido e foram descongeladas em temperatura ambiente. Embora todas as sementes das espécies estudadas mostrassem

tolerância à criopreservação nos casos de *Cassia ferruginea*, *Platypodium elegans*, *Sclerobium aureum* e *Roupala montana* as taxas de germinação após a imersão em nitrogênio líquido foram menores do que o controle. A espécie da família Bignoniaceae estudada por Wetzell *et al.*, (2003) foi *Tabebuia umbellata*.

Tarré *et al.* (2007) estudaram a tolerância à criopreservação de 8 espécies da família Bromeliaceae nativas da Mata Atlântica, sendo 6 espécies do gênero *Encholirium* e 2 espécies do gênero *Dyckia*. É importante ressaltar que 6 espécies do gênero *Dyckia* estão na lista das espécies brasileiras ameaçadas de extinção. Concluíram que todas as espécies resistiram à criopreservação. O teor de umidade das sementes variou de 11,2% a 28,2% e para *Encholirium pedicellatum* as sementes tiveram que ser desidratadas para atingir 2,5% de teor de umidade. O descongelamento foi realizado em temperatura ambiente.

Lima *et al.* (2008) estudaram a tolerância à criopreservação de 19 espécies da floresta decídua do vale do Rio Paraná, em Goiás, pertencentes às famílias Anacardiaceae, Apocynaceae, Bombacaceae, Boraginaceae, Bignoniaceae, Caesalpinoideae, Fabaceae, Meliaceae, Mimosaceae e Sterculiaceae. O teor de água das sementes variou de 5,7% (*Jacaranda brasiliana*) a 12% (*Myracrodruon urundeuva*). As sementes permaneceram imersas no nitrogênio líquido por 3 dias e foram descongeladas em temperatura ambiente. Observaram que todas as espécies toleraram a criopreservação mas em algumas delas como em *Hymenaea courbaril* (teor de água de 5,8%) e *Aspidosperma pyriforme* (teor de água de 6,8%) a viabilidade foi reduzida. As espécies de Bignoniaceae estudadas por esses autores foram *Jacaranda brasiliana*, *Tabebuia aurea* e *Tabebuia impetiginosa*.

Em todos os trabalhos mencionados acima foram testados apenas curtos períodos (de 3 a 15 dias) de armazenamento em nitrogênio líquido e não há referências de estudos sobre a normalidade das plântulas produzidas a partir das sementes armazenadas. Os estudos sobre períodos prolongados de armazenamento em nitrogênio líquido são mais escassos e recentes. Zanotti *et al.* (2007) demonstraram que sementes de *Caesalpinia echinata* (Pau-brasil) toleram o armazenamento criogênico por 6 meses produzindo plântulas normais. As sementes de *C. echinata* são ortodoxas e apresentam teor de umidade de 9,7% mas perdem a viabilidade após 3 meses em seu ambiente natural. Anteriormente, Hellmann *et al.*, (2006) haviam observado que as sementes de *C. echinata*, quando armazenadas a -18°C por 24 meses, produziram apenas 80% de plântulas normais o que indica que a criopreservação assegura com maior eficiência a disponibilidade de plântulas para os programas de reflorestamento. Estudos adicionais sobre a eficiência de períodos prolongados de armazenamento criogênico (de 4 a 26 meses) são relatados por Pilatti *et al.* (2010) para

sementes de *Cecropia glazioui* (Cecropiaceae), *Cybistax antisiphilitica*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tabebuia avellanadae*, *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae) e para *Cedrela fissilis* (Meliaceae) e em todos os casos foram produzidas plântulas saudáveis. Apesar da relevância dos protocolos de criopreservação de sementes desenvolvidos nos trabalhos acima relatados é de extrema urgência que tais estudos sejam conduzidos com outras espécies florestais nativas, como forma alternativa de garantir a conservação de germoplasma *ex situ* a longo prazo.

Inúmeras aplicações da cultura *in vitro* de tecidos de plantas têm sido observadas para diferentes finalidades como: melhoramento genético de plantas, recuperação de genótipos livres de vírus e outros agentes patogênicos, micropropagação comercial de plantas, transformação genética, cultivo de suspensões celulares, biossíntese de metabólitos secundários em biorreatores, intercâmbio conservação *in vitro* de germoplasma, obtenção de plantas haplóides por meio da cultura de anteras, obtenção de variantes somaclonais, microenxertia e cultura de protoplastos (PEREIRA *et al.*, 2009). Técnicas baseadas na micropropagação de plantas podem ser empregadas com sucesso para garantir a produção constante de mudas em larga escala de genótipos selecionados, visando a conservação e melhoramento genético (THORPE e KUMAR, 1993). A micropropagação tem sido ferramenta útil para muitas espécies florestais de importância econômica ou que se encontram em extinção (RIBAS, 2005). A aplicação de técnicas de cultura *in vitro* para o desenvolvimento de cultura de células e órgãos de espécies de árvores raras, que possuem grande valor econômico e que produzem compostos biologicamente ativos, representa um enorme potencial a ser explorado. Esses sistemas podem ser utilizados em estudos sobre as vias de biossíntese dos compostos de interesse e para otimizar a produção de metabólitos secundários *in vitro* (NUNES, 2000).

Os estudos sobre a cultura *in vitro* de espécies nativas brasileiras têm sido desenvolvidos para considerável número de espécies e concentram-se prioritariamente na germinação *in vitro* de sementes, micropropagação, embriogênese somática, cultura de embriões zigóticos e sistemas de cultura de calos, processos que podem ser utilizadas para futuros estudos sobre conservação *in vitro* de germoplasma (PILATTI *et al.*, 2010). Segundo esses autores poucos trabalhos foram conduzidos sobre a criopreservação de propágulos vegetativos (ápices e segmentos nodais foliares ou cotiledonares) ou de embriões somáticos, exceto para espécies de importância agrônômica. É importante ressaltar o baixo número de trabalhos desenvolvidos para espécies da família Bignoniaceae, em especial do gênero *Tabebuia*. Cabral *et al.* (2003) relata que as sementes de *Tabebuia impetiginosa*, espécie

medicinal nativa do Cerrado, que consta da lista das espécies ameaçadas de extinção e está na lista para conservação *ex situ* do Instituto Florestal de São Paulo, apresenta sementes com baixa longevidade, sendo que 8% das sementes produzidas são vazias e 17% apresentam embriões zigóticos anormais, o que causa restrições à conservação em bancos de sementes. Martins, J. *et al.* (2009) desenvolveu protocolos para germinação *in vitro* e multiplicação de ramos, a partir de segmentos nodais de plantas axênicas, que podem ser utilizados para trabalhos futuros sobre a conservação *in vitro* de germoplasma. Na literatura internacional o único artigo sobre cultura *in vitro* de *Tabebuia* refere-se à produção de naftoquinonas com ação antitumoral por calos e culturas de células de *Tabebuia avellanedae* (UEDA *et al.*, 1994), destacando o potencial de aplicação de estratégias biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos eficientes de conservação de sementes de *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia pentaphylla* e estabelecer sistemas de micropropagação e cultura de calos de *Tabebuia avellanadae* e *Tabebuia roseoalba*, que possam ser utilizados para conservação de germoplasma e estudos sobre metabólitos secundários.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de água das sementes de *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia pentaphylla* após os diferentes períodos de armazenamento;
- Determinar a viabilidade das sementes, através de testes de germinação, após diferentes períodos de armazenamento em nitrogênio líquido (196°C), freezer (-20°), congelador (0°C), geladeira (5°C) e temperatura ambiente (25°C);
- Avaliar o crescimento das plantas produzidas a partir das sementes armazenadas nas diferentes condições citadas acima.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas sobre a multiplicação *in vitro* de *Tabebuia avellanadae* e *Tabebuia roseoalba*;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de auxinas sobre a indução de calos *in vitro* de *Tabebuia avellanadae* e *Tabebuia roseoalba*;
- Caracterizar a estrutura e ultra-estrutura de calos de *Tabebuia avellanadae*;
- Proceder à análise fitoquímica preliminar dos calos de *Tabebuia avellanadae*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *TABEBUIA ROSEOALBA* E *TABEBUIA PENTAPHYLLA*

4.1.1 Material Vegetal

Foram utilizadas neste trabalho sementes de *Tabebuia roseoalba* (lote 195/06 com índice de germinação de 90%, coletado em setembro de 2006) e sementes de *Tabebuia pentaphylla* (lote 180/07 com índice de germinação de 89%, coletado em outubro de 2007), adquiridas do Instituto Florestal de São Paulo e coletadas na Estação Ecológica de Assis, São Paulo.

4.1.2 Determinação do teor de água das sementes

Para a determinação do teor de água, foram utilizadas três repetições de 25 sementes para cada tratamento. Inicialmente foi determinada a massa fresca e em seguida as sementes foram mantidas em estufa a 103°C por 17 horas (ISTA, 1985), para determinar a massa seca. O teor de água foi calculado pela diferença entre a massa fresca e a massa seca das repetições, dividido pela massa seca, e os valores expressados em porcentagem (%) da massa fresca (BEWLEY e BLACK, 1994).

4.1.3 Condições de armazenamento

As sementes foram armazenadas durante os períodos estabelecidos para cada experimento nas diferentes condições: nitrogênio líquido (-196°C), freezer (-20°C), congelador (0°C), geladeira (5°C) e temperatura ambiente (25°C). Para o armazenamento a -196°C as sementes foram separadas em pequenos envelopes de papel alumínio, contendo 125

sementes cada, e em seguida, imersas diretamente em nitrogênio líquido. Para as demais condições as sementes foram armazenadas em placas de Petri vedadas com filme de PVC. Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições de 25 sementes.

4.1.4 Germinação das sementes

As sementes foram removidas das condições de armazenamento e colocadas para germinar em embalagens de polietileno de 15 cm x 10 cm x 7 cm, com tampa, sobre duas folhas de papel toalha umedecidas com 40 ml de água destilada .

As sementes mantidas em nitrogênio líquido foram expostas à temperatura ambiente, por 30 minutos (descongelamento lento), antes de serem colocadas para germinar nas condições acima. As porcentagens de germinação das sementes foram avaliadas em intervalos de dois dias e utilizadas cinco repetições de 25 sementes por tratamento.

Os experimentos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 horas provido, por Lâmpadas Fluorescentes Phillips TDL, com fluxo de fótons de $22,3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 70%.

4.1.5 Índice de velocidade de germinação

Para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962) citado por Ferreira e Borghetti (2004), sendo calculado pela soma das sementes germinadas, multiplicada pelo inverso do número de dias ocorridos da sementeira a contagem ($\text{IVG} = \sum \text{Gn}/\text{Nn}$, onde G é número de sementes germinadas e N o número de dias após a sementeira). As avaliações foram realizadas até a estabilização da germinação das sementes.

4.1.6 Crescimento das plântulas

As plântulas obtidas da germinação de sementes armazenadas em diferentes condições foram transferidas para sacos plásticos pretos perfurados na lateral e na base, com 10 cm de altura e 6 cm de diâmetro, contendo substrato composto por argila, adubo orgânico e areia (1:1:1). Foram mantidas por 7 dias em sala de crescimento e depois transferidas para uma área externa (condições naturais durante o verão), sob tela sombrite de 50% de corte de luz, permanecendo nessas condições por 70 dias.

4.1.7 Determinação da área foliar e massa seca

A área foliar foi obtida através do delineamento dos contornos das folhas em papel sulfite A4 e determinada através do uso de planímetro digital (Haff-Digiplan).

Para obtenção da massa seca, as plantas foram separadas em folhas, raízes e parte aérea e colocadas para secar a 80°C por 48 horas (até atingirem peso constante), sendo, a seguir, pesadas em balança digital com aproximação de três casas decimais.

4.1.8 Análise Estatística

Os experimentos foram montados seguindo-se o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA), com separação de médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$), para comparação de mais de dois tratamentos, ou utilizando-se o teste t ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$), quando a comparação se restringiu a dois tratamentos. Os dados em porcentagem foram transformados em arcoseno $\sqrt{0}$ antes de serem submetidos aos testes estatísticos (GOMEZ e GOMES, 1984). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa de software Statistica, versão 6.0 (STATSOFT, 2001).

4.2 CULTURA *IN VITRO* DE *TABEBUIA ROSEOALBA* E *TABEBUIA AVELLANEDAE*

4.2.1 Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas sementes e plântulas axênicas de *Tabebuia roseoalba* e de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Grisebach.. As sementes de *Tabebuia avellanedae* foram adquiridas do Instituto Florestal de São Paulo e coletadas na Floresta Estadual de Assis, São Paulo, em agosto de 2006. As plantas axênicas foram fontes dos explantes para realização dos experimentos de cultura *in vitro*.

4.2.2 Desinfecção das sementes

As sementes, após serem lavadas abundantemente com água corrente, foram desinfetadas em condições assépticas, utilizando-se uma solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa ®) com 2.5% (v/v) de cloro ativo, acrescida de cinco gotas de detergente neutro, por 20 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada autoclavada e inoculadas em meio de cultura.

4.2.3 Preparação dos meios de cultura

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o meio de cultura MS básico (MURASHIGE e SKOOG, 1962), preparação comercial em pó, produzida pela Sigma Chemical Co., suplementado com 20 g/L (m/v) de sacarose e 2 g/L (m/v) de Phytigel e, Iguns experimentos específicos, foram suplementados reguladores de crescimento em diferentes concentrações. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem, pela adição de NaOH 0.1 M ou HCl 0.1 N. Nos experimentos foram utilizados tubos de ensaio de 25 x 150 mm, com 8 mL de meio de cultura por tubo. Em todos os casos, os tubos foram fechados com tampas de polipropileno. A autoclavagem foi realizada por 18 minutos a $\pm 1,25$ kgf/cm², em

temperatura de 120°C. Estes procedimentos foram utilizados em todos os experimentos descritos a seguir.

4.2.4. Estabelecimento de plântulas axênicas e condições de crescimento das culturas

As sementes desinfetadas foram inoculadas em meio de cultura MS básico, suplementado com 20 g/L (m/v) de sacarose e 2 g/L (m/v) de Phytigel. Os tubos de ensaio foram fechados com filme de polipropileno, presos com elásticos de borracha. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($22.3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e umidade relativa de 70%. Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos, exceto quando especificado.

4.2.5 Efeito de reguladores de crescimento sobre a micropropagação

Segmentos nodais cotiledonares, foliares e apicais (0,8-1,2 cm) foram excisados de plântulas axênicas com 30-35 dias de idade. Os explantes foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS suplementado com 20 g/L (m/v) de sacarose, 2 g/L (m/v) de Phytigel e de diferentes concentrações (0, 1,25, 2,5 e 5 μM) das citocininas BAP (6-benzilaminopurina) ou Cinetina (6-Furfurilaminopurina), utilizadas isoladamente. Foram utilizadas 12 repetições com duas amostras para cada tratamento. As culturas foram avaliadas após 8 semanas quanto à frequência de formação de calos, ramos, raízes e massa fresca total.

4.2.6 Efeito de auxinas sobre o crescimento dos calos

Foram utilizados como explantes, segmentos nodais cotiledonares (segmentos de 1 cm de comprimento de caule, contendo as gemas axilares existentes nos pontos de inserção

dos cotilédones) e segmentos nodais foliares (segmentos de 1 cm de comprimento do caule, contendo gema foliar). Os explantes foram removidos de plântulas axênicas de 6 meses de idade e inoculados em tubos de ensaio, contendo o meio de cultura MS suplementado com 20 g/L (m/v) de sacarose, 2 g/L (m/v) de Phytigel e de diferentes concentrações (0, 1,25, 2,5 e 5 μ M) das auxinas ácido *a*-naftalenoacético (ANA), ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido indolbutírico (AIB). O crescimento das culturas foi avaliado 10 semanas após o início do experimento, através da determinação da massa fresca total das culturas, massa fresca do calo e razão massa fresca do calo/massa fresca total das culturas. Foram utilizadas no mínimo 11 repetições com duas amostras cada por tratamento.

4.2.7 Efeito de tipos de explantes sobre o crescimento de calos

Foram utilizados como explantes, segmentos nodais cotiledonares (segmentos de 1cm de comprimento de caule, contendo as gemas axilares existentes nos pontos de inserção dos cotilédones) e segmentos nodais foliares (segmentos de 1cm de comprimento do caule, contendo as gemas axilares existentes nos pontos de inserção do par de folhas), segmentos do hipocótilo (segmentos de 1 cm de comprimento), segmentos de folhas e de cotilédones (segmentos de 1cm² contendo a nervura central). Os explantes foram removidos de plântulas de 6 meses e inoculados em tubos de ensaio, contendo o meio de cultura MS suplementado com 20 g/L (m/v) de sacarose, 2 g/L (m/v) de Phytigel e com ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações de 0, 1,25, 2,5 e 5 μ M. O crescimento dos calos foi avaliado após 10 semanas do início do experimento, através da determinação da massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca e o teor de água. Foram utilizadas no mínimo 11 repetições com duas amostras cada por tratamento.

4.2.8 Determinação da massa seca e do teor de água de calos

Para a determinação da massa fresca, os calos foram pesados imediatamente após a remoção do meio de cultura e para a determinação da massa seca, os calos foram transferidos para placas de Petri de 12 cm de diâmetro e mantidos em estufa, por 48 horas a

85°C. O teor de água dos calos foi expresso em porcentagem da massa fresca e determinado através das seguintes fórmulas:

Fórmula: Teor de água (% da massa fresca) = (massa fresca – massa seca)/massa fresca x 100.

4.2.9 Análise Estatística

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student, ao nível de 5% de probabilidade, quando a comparação se restringiu a apenas dois tratamentos, ou de análise de variância simples ou multifatorial, com separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, quando mais de dois tratamentos foram comparados (GOMEZ E GOMEZ, 1984). Todas análises foram realizadas utilizando-se o programa de software Statistica, versão 6.0 (STATSOFT, 2001).

4.3 ANÁLISES EM MICROSCOPIA ÓTICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Foram utilizados calos de *Tabebuia avellaneda* cultivados *in vitro* no Laboratório de Cultura no Departamento de Botânica (CCB/UFSC). Deste material foram processadas três diferentes amostras de calos jovens com 20 dias de cultivo, calos maduros com 40 dias de cultivo, ambos provenientes de plântulas com 8 meses de idade utilizadas na remoção dos explantes e calos maduros (40 dias de cultivo), oriundos de plântulas com 4 meses de idade.

4.3.1 Cultura e processamento do material biológico

O material biológico foi transportado, em tubos de ensaio e sob condições ambientais (25°C), ao Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), Departamento de Biologia, Embriologia e Genética (BEG/UFSC), onde ocorreu o processamento das amostras para microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), e posteriormente as análises histoquímicas.

4.3.2 Condições de cultivo das amostras

Provenientes de germinação *in vitro*, plântulas axênicas de *Tabebuia avellanadae* foram cultivadas por 4 e 8 meses conforme as condições descritas no item 4.2.4, e empregadas como fonte de explantes para indução de calos. Utilizou-se segmentos caulinares de 1 cm contendo gemas laterais, removidos e inoculados na posição horizontal, em meio de cultura MS básico suplementado antes da autoclavagem com 1,25 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Nestas condições foram coletados calos jovens com 20 dias e calos maduros com 40 dias de cultivo, para análises em microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão.

4.3.3 Microscopia ótica (MO)

Para observações morfológicas e citoquímicas dos calos de *T. avellanadae*, as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5 % diluído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, durante 8 h, em geladeira temperatura de 4° C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por 20 minutos em cada troca (Bouzon, 1993), seguido da desidratação em uma série etílica (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 20 minutos em cada concentração à temperatura ambiente. A pré-infiltração das amostras foi realizada com uma mistura de 1:1 de etanol a 100% e historesina glicolmetacrilato (GMA®), durante 12 h, posteriormente o material foi infiltrado em resina pura por 12 h. A inclusão foi realizada na

mesma resina em histo-moldes com adição de polimerizador (para os 3 ml de historesina foram utilizados 200µL de hardner), à temperatura ambiente, por 3 h para endurecer (Arnold *et al.* 1975, modificado). Em seguida os blocos permaneceram em placas de Petri com sílica, dentro de estufa a 60 ° C para manter o material desidratado. As amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio e de aço. As secções com espessura de 5 µm foram coletadas com pinça, distendidas sobre gotas de água destilada à temperatura ambiente sobre lâminas de vidro, e secas sobre placa aquecedora a 37 °C por 30 minutos.

4.3.4 Testes Citoquímicos

As amostras foram submetidas aos seguintes testes citoquímicos, para registro de características morfológicas em relação às observações de proteínas totais e de polissacarídeos ácidos e neutros.

4.3.4.1 Observação de proteínas totais

As proteínas totais foram identificadas com o corante azul brilhante de Coomassie (CBB). As lâminas contendo as secções foram coradas com CBB 0,02 % diluído em solução etanólica acidificada de Clarke, por 24 h. Posteriormente foram lavadas na mesma solução, seguido de água destilada, secas ao ar (GAHAN, 1984). O controle foi realizado com digestão enzimática antes da coloração descrita acima. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

4.3.4.2 Polissacarídeos ácidos

Para observar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia (O'BRIEN e McCULLY, 1981), foi utilizado o corante azul de toluidina (AT-O). As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução de AT-O 0,5% pH 3,0, por 30-60 segundos, lavadas em água destilada, secas ao ar (GORDON-MILLS e McCANDLESS, 1973; McCULLY, 1970). E posteriormente as lâminas montadas com bálsamo do Canadá.

4.3.4.3 Polissacarídeos neutros

A presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose) foi observada utilizando o método PAS - Ácido Periódico de Schiff. As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 30 minutos, lavados em água corrente e corados com reativo de Schiff por 30 minutos, até a retirada do excesso de corante, secas ao ar e montadas com bálsamo do Canadá. Como controle negativo da reação de PAS foi realizado omitindo a oxidação pelo ácido periódico, e em seguida as secções foram submetidas à coloração descrita acima (GAHAN, 1984).

As observações e registros dos diferentes tratamentos foram feitos em microscópio óptico Olympus BX 40 adaptado com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América Ind.).

4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise de ultraestruturas por meio de microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram pré-fixadas em solução contendo glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 2%, sacarose 2%, e tamponada com cacodilato 0,1 M, pH 7,2 (concentrações finais). A pré-fixação foi realizada em *overnight* na geladeira. A pré-fixação foi seguida por quatro lavagens (30 minutos cada lavagem) no mesmo tampão e sacarose 2% em concentrações decrescentes. Após as lavagens o material foi pós-fixados em OsO₄ (tetróxido

de ósmio) a 1% diluído em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, durante 4 h à temperatura ambiente em capela (Bouzon *et al.*, 2000).

Posteriormente, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 (30 minutos cada lavagem) em seguida lavado em água destilada (30 minutos) a temperatura ambiente. Após as lavagens o material foi desidratado em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), com duração de 30 minutos em cada etapa, e na última série de acetona 100% foi repetida três vezes.

Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr (Spurr, 1969). Para preparação da Resina Spurr utilizada, os reagentes foram pesados em um becker sobre a balança de precisão tarando após a adição de cada quantidade necessária dos reagentes descritos a seguir. Foram adicionados 13g de NSA (Nonenyl succinic anhydride), 5g de VCD/ERL (Vinyl cyclohexene dioxide), 3g de DER (Epoxy Resin) e 0,2g de DMAE (Dimethylaminoethanol). Após a pesagem, o becker foi colocado por 10 minutos para homogeneizar com auxílio de um agitador magnético em baixa velocidade sobre placa aquecedora.

Para infiltração foram realizadas 7 etapas (a-g) cada uma com duração de 12 horas. Num período de 4 dias em resina Spurr diluída em acetona nas seguintes proporções (a) 1:3; (b) 1:2; (c) 1:1; (d) 2:1; e (e) 3:1. No quinto dia aconteceram as etapas (f) e (g), que por duas vezes ocorreu a troca por resina pura e as amostras mantidas em condições de vácuo.

O material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70°C por 24 h. A seguir os blocos permaneceram em placas de Petri com sílica, dentro de estufa a 60 °C para manterem desidratados.

No Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) foram feitos os cortes ultrafinos com navalha de diamante e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 - TEM 100KV.

4.4 ANÁLISES FITOQUÍMICAS DE CALOS DE *TABEBUIA AVELLANEDAE*

4.4.1 Material Vegetal

Foram utilizados calos de *Tabebuia avellanedae* originados a partir da cultura de segmentos caulinares de 1 cm contendo gemas laterais, removidos de plântulas axênicas e inoculados na posição horizontal, em meio de cultura MS suplementado com 20 g/L (m/v) de sacarose, 2 g/L (m/v) de Phytigel e com 1,25 μ M de ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

4.4.2 Análise por Eletroforese Capilar do extrato hidroalcoólico de calos de *Tabebuia avellanedae*

Amostras de 5 g de calos fresco foram trituradas com etanol e deixadas em eficiente agitação por duas horas. O material foi filtrado e concentrado sob vácuo em rotaevaporador em temperatura controlada (40-45 °C). Uma amostra do extrato hidroalcoólico obtido foi dissolvida numa mistura de etanol, metanol e água deionizada, na proporção de aproximadamente 10 mg de extrato para 10 mL de solvente. As condições analíticas utilizadas foram as seguintes: o eletrólito de corrida foi composto de tetraborato de sódio 20 mmol L⁻¹ e 10 % de metanol. Capilar de sílica fundida L_{tot} 48,5 cm, L_{det} 40 cm, 50 μ m D. I.. A tensão aplicada foi de 25 kV (polaridade positiva no lado da injeção). A introdução da amostra no sistema eletroforético foi pela técnica de injeção por pressão 50 mbar/3 s. A temperatura do capilar foi de 25°C com detecção direta em 200 nm. A análise foi realizada em equipamento de eletroforese capilar HP3DCE da marca Agilent Technologies.

4.4.3 Análise por CGAR-EM dos constituintes voláteis de calos de *Tabebuia avellanedae*

Para os procedimentos de microextração em fase sólida–SPME dos constituintes voláteis de calos foi utilizada fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μ m de espessura

(supelco, Bellefonte, PA, USA). A fibra foi termicamente condicionada a 300 °C no injetor do cromatógrafo gasoso antes do uso. Uma porção de 0,5 g de cultura de calos fresca foi transferida para um frasco de 16 ml especial para SPME contendo uma barra vestida de teflon para agitação magnética e selado com um septo. A amostra foi mantida sob eficiente agitação magnética e a fibra de PDMS foi exposta ao “headspace” da amostra por uma hora. Após, a fibra foi removida e imediatamente inserida no injetor do cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas, permitindo um tempo de desorção de 10 minutos.

As análises CG-MS dos constituintes voláteis dos calos foram realizadas usando-se um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 5890 Series II, com detector de massas (MS) acoplado e injetor “split-splitless”. As condições instrumentais de operação utilizadas foram as seguintes: temperatura constante do injetor e interface do detector 250 e 280°C respectivamente; condições do forno: a temperatura inicial da coluna foi de 35°C durante 3 minutos; a taxa de aquecimento utilizada foi de 10°C/min até uma temperatura final de 280°C onde permaneceu nesta temperatura por 1 minuto. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 28,5 minutos. A coluna utilizada no cromatógrafo foi a coluna capilar de sílica fundida Agilent HP-5 MS, não-polar (5% - fenil)-metilpolisiloxano, com 30 mm x 0,25 mm de diâmetro interno e com fase de recobrimento de 0,25 µm foi usada em todas as análises cromatográficas. O gás carreador utilizado foi o hélio (taxa de fluxo: 1,0 mL/min); Vazão de split: as amostras foram injetadas utilizando-se o modo *splitless* durante todas as análises. Os parâmetros do detector foram os seguintes: tempo do solvente 4 minutos, variação de massa de 35 a 450 m/z; Manipulação dos dados: os dados foram coletados usando-se um computador (PC) com software Hewlett Packard *ChemStation*, versão B-01-00.

5 RESULTADOS

5.1 GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *TABEBUIA ROSEOALBA* E *TABEBUIA PENTAPHYLLA*

5.1.1 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) sobre a viabilidade das sementes de *Tabebuia roseoalba*

Os resultados descritos a seguir são de experimentos realizados para avaliar a viabilidade das sementes de *Tabebuia roseoalba* armazenadas em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) por períodos curtos, de 1 a 4 semanas, e por períodos longos (de 6 a 25 meses).

O início da germinação ocorreu entre 2-3 dias após a montagem do experimento para as sementes armazenadas em temperatura ambiente e geladeira. Nestes dois tratamentos, observou-se também que o ponto máximo de germinação ocorreu entre 12 a 15 dias. Os resultados da Tabela 1 indicam que a taxa máxima de germinação das sementes conservadas por 4 semanas em temperatura ambiente (60%) foi significativamente menor que as das sementes conservadas por 1 e 3 semanas em geladeira (74,4%). Os tratamentos de armazenamento por 2 e 4 semanas em geladeira não foram realizados em virtude da baixa disponibilidade de sementes. Observa-se que, até 3 semanas de armazenamento em temperatura ambiente, não houve diferença entre as taxas de germinação do controle e dos tratamentos de armazenamento em geladeira.

Observa-se na Tabela 2 que as sementes armazenadas em geladeira por períodos de 19 e 25 meses, a partir do momento da coleta apresentaram taxas máximas de germinação (67,2 e 60,8%) significativamente menores do que a verificada no tratamento de 6 meses de armazenamento (86,4%) a partir da data da coleta. Os índices de velocidade de germinação foram significativamente menores após 19 e 25 meses de armazenamento. A porcentagem de germinação das sementes no momento da coleta era de 90%.

Tabela 1. Efeito do armazenamento de sementes de *Tabebuia roseoalba* em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C), por períodos de 1 a 4 semanas, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.

Tratamentos	Período (semanas)	Germinação máxima (%) ^a
Controle	0	67,2 ab
Geladeira	1	74,4 b
	3	74,4 b
Temperatura ambiente	1	68,0 ab
	2	65,6 ab
	3	67,2 ab
	4	60,0 a

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Efeito do armazenamento de sementes de *Tabebuia roseoalba* em geladeira (5°C), por períodos de 6, 19 e 25 meses, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.

Tempo de armazenamento (meses)	Germinação máxima (%) ^a	Índice de velocidade de germinação ^a
6 meses	86,40 b	8,7 b
19 meses	67,20 a	6,0 a
25 meses	60,80 a	3,8 a

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.1.2 Efeito da imersão em nitrogênio líquido (-196°C) sobre o teor de água, a viabilidade das sementes e o crescimento inicial das plantas de *Tabebuia roseoalba*

Os resultados descritos a seguir são de experimentos que visaram testar a tolerância das sementes de *Tabebuia roseoalba* à imersão em nitrogênio líquido, tendo sido conduzidos experimentos complementares para determinar o teor de água das sementes e observar o efeito da imersão em nitrogênio líquido sobre o crescimento inicial das plantas.

De acordo com a Tabela 3 o teor de água das sementes, no momento da realização dos experimentos de imersão em nitrogênio líquido foi de 8,6% da massa fresca.

Tabela 3. Teor de água de sementes de *Tabebuia roseoalba* no momento da montagem dos experimentos de imersão em nitrogênio líquido (-196°C).

Repetição	Teor de água (% MF) ^a
1	8,9
2	9,0
3	9,2
4	8,0
5	7,9
Média	8,6

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada. MF= massa fresca

A germinação das sementes do controle e dos tratamentos de imersão em nitrogênio líquido por 30 minutos, 1 hora e 24 horas teve início ao redor de 2-3 dias após a montagem do experimento. Os resultados da Tabela 4 indicam que ao final do experimento não foram observadas diferenças estatísticas entre as taxas máxima de germinação dos tratamentos de imersão em nitrogênio líquido e controle. As porcentagens máximas de germinação obtidas variaram entre 75,2% (24 horas em nitrogênio líquido) e 87,2% (30 min. em nitrogênio líquido).

O crescimento em termos de massa seca da raiz, massa seca da parte aérea, massa seca total, área foliar e razão entre as massas secas da raiz e da parte aérea das plantas imersas por uma hora em nitrogênio líquido não diferiu significativamente do crescimento observado nas plantas oriundas de sementes que não foram imersas em nitrogênio líquido (Tabela 5).

Tabela 4. Efeito da imersão em nitrogênio líquido (-196°C), por períodos de 30 minutos, 1 h e 24 h sobre a germinação máxima de sementes de *Tabebuia roseoalba*, alcançada 12 dias após o início do experimento.

Período de imersão em nitrogênio líquido	Germinação máxima (%) ^a
0	86,4 a
30 min	87,2 a
1 h	80,8 a
24 h	75,2 a

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 5. Massa seca de órgãos, área foliar e razão raiz/parte aérea (R/PA) de plantas de *Tabebuia roseoalba* de 70 dias de idade, originadas a partir de sementes conservadas em geladeira por (controle) ou imersas em nitrogênio líquido (-196°C) por 1h, seguido de descongelamento lento.

Trata-mento	Raiz (mg) ^a	Parte aérea (mg) ^a	Total (mg) ^a	Área foliar (cm ²) ^a	R/PA ^a
Controle	43±08a	292±110a	341±118a	36±13 ^a	0,26±0,07 ^a
NL	51±19a	261±116a	312±142a	33±14 ^a	0,27±0,08 ^a

^aMédias de pelo menos 6 repetições seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ao nível de 5% pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$). NL= nitrogênio líquido

5.1.3 Efeito da segunda imersão em nitrogênio líquido (-196°C) sobre a viabilidade das sementes de *Tabebuia roseoalba*

Os resultados descritos abaixo são de experimentos que visaram determinar a tolerância das sementes de *Tabebuia roseoalba* à segunda imersão em nitrogênio líquido, após o armazenamento por 1 ou 3 semanas em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C). O objetivo destes experimentos foi verificar se as sementes mantidas criopreservadas em um banco de germoplasma tolerariam o armazenamento fora do nitrogênio líquido por períodos curtos e se poderiam ser criopreservadas novamente.

5.1.3.1 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C)

Sementes criopreservadas e mantidas por uma semana a temperatura ambiente e retornando ao nitrogênio líquido resultaram em maior (77,6%) e significativa taxa de germinação em relação ao tratamento de criopreservação seguido do armazenamento por 1 semana em temperatura ambiente (54,4%) (Tabela 6). Este sistema mostrou-se com potencial para utilização em bancos de germoplasma e com possibilidade de serem vendidas ou enviadas para outros bancos de germoplasma.

Tabela 6. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de *Tabebuia roseoalba* em temperatura ambiente (25°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda imersão em nitrogênio líquido (-196°C), sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.

Tratamentos	Germinação máxima (%)^a
1h NL	66,4 ab
NL+ 1 semana TA	54,4 a
NL+ 1 semana TA+ NL	77,6 b
NL+ 3 semanas TA	67,2 ab
NL+ 3 semanas TA+ NL	64,8 ab

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NL = nitrogênio líquido, TA = temperatura ambiente.

5.1.3.2 Efeito do armazenamento em geladeira (5°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C)

Fato semelhante ao encontrado na Tabela 6 também foi observado quando as sementes criopreservadas foram mantidas em ambiente de geladeira por uma semana e criopreservadas novamente revelando alta taxa de germinação (74,4 %) após 12 dias de cultivo (Tabela 7). A taxa máxima de germinação das sementes mantidas por 3 semanas em geladeira, após a criopreservação, foi significativamente menor (43,2 %) em relação ao controle e aos tratamentos de armazenamento por 1 semana em geladeira, seguido ou não da segunda criopreservação.

Tabela 7. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de *Tabebuia roseoalba* em geladeira (5°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.

Tratamentos	Germinação máxima (%)^a
1h NL	66,4 b
NL+ 1 semana GEL	47,2 b
NL+ 1 semana GEL+NL	74,4 b
NL+ 3 semanas GEL	43,2 a
NL+ 3 semanas GEL+NL	55,2 ab

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NL= nitrogênio líquido, GEL = geladeira.

5.1.3.3 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C)

A Tabela 8 mostra as porcentagens máximas de germinação dos tratamentos em que as sementes foram imersas em nitrogênio líquido, conservadas em temperatura ambiente ou geladeira por diferentes períodos e em seguida submetidas à nova criopreservação. Verifica-se que as taxas máximas de germinação das sementes submetidas à segunda criopreservação, após os armazenamentos por 1 semana em temperatura ambiente ou geladeira (77,6% e 74,4%, respectivamente) foram significativamente superiores em relação ao tratamento em que foram armazenadas em geladeira por 3 semanas antes da segunda criopreservação (55,2%), mas não diferiram significativamente do controle (66,4%). Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de velocidade de germinação dos diferentes tratamentos.

Tabela 8. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de *Tabebuia roseoalba* em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.

Tratamentos	Germinação máxima (%) ^a	Índice de velocidade de germinação ^a
1h NL	66,4 ab	6,9 a
NL+ 1 semana TA+ NL	77,6 b	7,3 a
NL+ 3 semanas TA+ NL	64,8 ab	6,9 a
NL+ 1 semana GEL+NL	74,4 b	8,0 a
NL+ 3 semanas GEL+NL	55,2 a	7,3 a

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NL = nitrogênio líquido, TA = temperatura ambiente, GEL = geladeira.

5.1.4 Efeito do armazenamento por 10 meses em freezer (-20°C), geladeira (5°C), congelador (0°C) ou nitrogênio líquido (-196°C) sobre o teor de água, a viabilidade das sementes e o crescimento inicial das plantas de *Tabebuia roseoalba*

Os resultados descritos abaixo são de experimentos que visaram determinar a viabilidade das sementes de *Tabebuia roseoalba* após o armazenamento por 10 meses em

temperatura ambiente (25°C), geladeira (5°C), congelador (0°C), freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C). Também são descritos os resultados de experimentos complementares para determinar o teor de água das sementes, após o armazenamento por 10 meses em temperatura ambiente ou geladeira e sobre o crescimento das plantas originadas a partir das sementes armazenadas por 10 meses em freezer, geladeira e nitrogênio líquido.

O teor de água adequado é um dos componentes essenciais para a manutenção da viabilidade das sementes. Com relação ao teor de água, os resultados da Tabela 9 indicam que os menores teores de água de 6,6 e 6,7% da massa fresca foram observados, respectivamente, nas sementes do controle, cujo teor de água foi determinado no início do experimento e nas armazenadas em geladeira, mas as diferenças entre esses dois tratamentos não foram significativas. Diferenças significativas no teor de água foram detectadas nas sementes armazenadas em temperatura ambiente (8,3%), indicando aumento no teor de água, após dez meses de armazenamento nesta condição, em relação ao teor de água inicial.

Tabela 9. Teor de água de sementes de *Tabebuia roseoalba* armazenadas em geladeira (5°C) e temperatura ambiente (25°C) por 10 meses.

Tipo de armazenamento	Teor de água (%MF)^a
Controle	6,6 a
Geladeira	6,7 a
Temperatura ambiente	8,3 b

^aMédias de 5 repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF= massa fresca.

A Figura 1 indica que, após dez meses de armazenamento em freezer, geladeira e nitrogênio líquido, os valores máximos de germinação foram de 92,0%, 93,6% e 92,2%, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre os mesmos e nem em relação ao controle realizado no início do experimento (86,4%). Em todos os tratamentos a germinação iniciou ao redor do terceiro dia do início do experimento atingindo a máxima porcentagem após doze dias. As sementes armazenadas nas condições de temperatura ambiente e congelador perderam totalmente a viabilidade após 10 meses de armazenamento.

Não foram observadas diferenças significativas em termos de altura, massa seca da parte aérea e massa fresca total das plantas com 30 e 60 dias de idade, originadas a partir de sementes armazenadas por 10 meses em geladeira e freezer (Tabela 10). Entretanto, os valores de altura obtidos para as plantas originadas de sementes mantidas em nitrogênio líquido foram significativamente superiores aos demais tratamentos, independente da idade

das plantas. Os valores de massa seca da parte aérea e massa fresca total das plantas com 60 dias de idade também foram superiores em relação aos demais tratamentos.

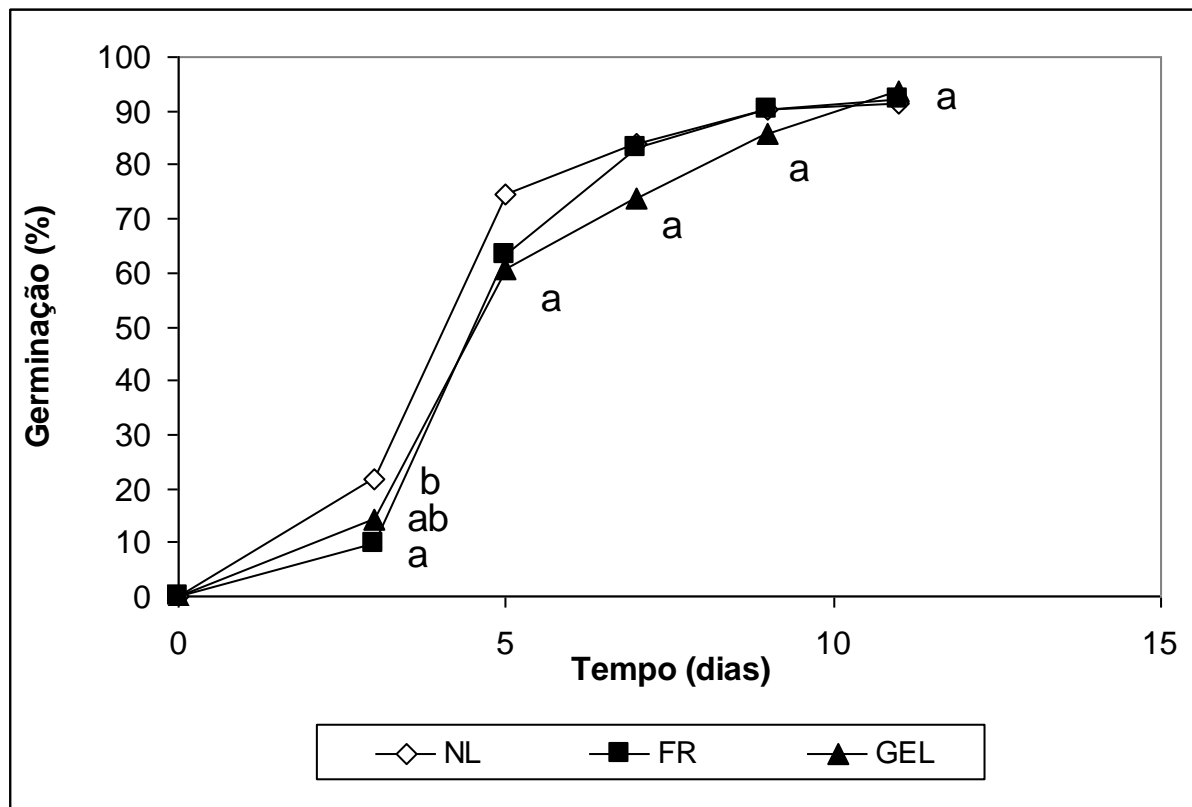


Figura 1. Germinação de sementes de *Tabebuia roseoalba* armazenadas em freezer (FZ, -20°C), geladeira (GL, 5°C) ou nitrogênio líquido (NL, -196°C) durante 10 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 10. Altura e valores de massa seca de plantas de *Tabebuia roseoalba* de 30 e 60 dias de idade, originadas a partir de sementes armazenadas por 10 meses em freezer (-20°C), geladeira (5°C) ou nitrogênio líquido (-196°C).

Tratamentos	Altura (cm) ^a		Massa seca parte aérea (mg) ^a		Massa fresca total (mg) ^a	
	30	60	30	60	30	60
Freezer	3,8 a	6,0 a	42,3 a	139,1 a	395,7 a	927,3 a
Geladeira	4,0 a	6,1 a	49,0 a	145,0 a	450,5 a	938,1 a
Nitrogênio líquido	4,7 b	7,5 b	49,6 a	206,1 b	458,7 a	1397,7 b

^aMédias de no mínimo 15 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.1.5 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) sobre a viabilidade das sementes de *Tabebuia pentaphylla*

Os resultados descritos a seguir são de experimentos para determinar a viabilidade das sementes de *Tabebuia pentaphylla*, após armazenamento em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C) por períodos curtos, de 1 a 4 semanas, por períodos 40 dias a 3 meses e por períodos longos, de 3 meses a 15 meses.

Os resultados da Tabela 11 indicam que não foram detectadas diferenças significativas entre as taxas máximas de germinação das sementes armazenadas em geladeira ou temperatura ambiente por períodos de 1 a 4 semanas, sendo que os valores variaram de 84,8% a 96,0%. A germinação, em todos os tratamentos teve início após 3 dias do início do experimento. Aos 7-8 dias as taxas de germinação atingiram valores variando entre 70% e 80% e alcançaram o valor máximo entre 10 e 15 dias, após o início do experimento.

Tabela 11. Efeito do armazenamento de sementes de *Tabebuia pentaphylla* em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C), por períodos de 1 a 4 semanas, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.

Tratamentos	Período (semanas)	Germinação máxima (%) ^a
Controle	0	89,6 a
Geladeira	1	96,0 a
	2	86,4 a
	3	89,6 a
	4	90,4 a
Temperatura ambiente	1	89,6 a
	2	88,8 a
	3	89,6 a
	4	90,4 a

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A Tabela 12 ilustra as porcentagens máximas de germinação dos tratamentos em que, as sementes foram armazenadas em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) por diferentes períodos. Verifica-se que não foram observadas diferenças significativas entre as taxas máximas de germinação dos tratamentos de armazenamento por 40 dias, 75 dias e 3 meses em geladeira (94,4%, 92,8% e 88,8%, respectivamente). Entretanto, a taxa máxima de germinação das sementes armazenadas por 3 meses em temperatura ambiente (41,6%) foi

significativamente inferior às obtidas após os armazenamentos por 40 dias e 75 dias (74,4% e 68,8%, respectivamente), na mesma condição.

Tabela 12. Efeito do armazenamento de sementes de *Tabebuia pentaphylla* em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C), por períodos de 40 dias a 3 meses, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.

Tratamentos	Períodos (dias)	Germinação máxima (%) ^a
Controle	0	89,6 d
Geladeira	40	94,4 d
	75	92,8 d
	90	88,8 cd
	Temperatura ambiente	40
Temperatura ambiente	75	68,8 b
	90	41,6 a

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados expressos na Tabela 13 indicam que as taxas máximas de germinação das sementes armazenadas por 3, 6, 13 e 15 meses em geladeira foram significativamente superiores às obtidas após o armazenamento por 3 e 6 meses em temperatura ambiente. Verifica-se também a queda significativa na viabilidade das sementes após 6 meses de armazenamento em temperatura ambiente.

Os dados da Tabela 14 indicam que, o armazenamento em geladeira reduziu significativamente o teor de água das sementes em relação ao valor do controle, observado no início do experimento. Verifica-se também que o teor de água das sementes, após 15 meses de armazenamento em geladeira, foi significativamente menor que os verificados após 3 e 6 meses de armazenamento na mesma condição.

Tabela 13. Efeito do armazenamento de sementes de *Tabebuia pentaphylla* em temperatura ambiente (25°C) e geladeira (5°C), por períodos de 3 a 15 meses, sobre a germinação máxima alcançada após 12 dias do início do experimento.

Tipos de armazenamento	Períodos (meses)	Germinação máxima (%) ^a
Temperatura ambiente	3	42,0 b
	6	8,0 a
Geladeira	3	88,8 c
	6	91,0 c
	13	92,0 c
	15	88,0 c

^aMédias de 5 repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 14. Teor de água de sementes de *Tabebuia pentaphylla* no momento de montagem do experimento (controle) e após armazenamento por 3, 6 e 15 meses em geladeira (5°C).

Tratamentos	Períodos (meses)	Teor de água (% MF) ^a
Controle	0	7,1 c
Geladeira	3	5,5 b
	6	6,0 b
	15	4,8 a

^aMédias de 5 repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (MF= massa fresca)

5.1.6 Efeito da imersão em nitrogênio líquido (-196°C) sobre o teor de água e a viabilidade das sementes de *Tabebuia pentaphylla*

De acordo com a Tabela 15 o teor de água das sementes no início dos experimentos foi de 7,1% da massa fresca.

A Figura 2 ilustra as porcentagens de germinação, no decorrer do tempo, dos tratamentos controle e imersão em nitrogênio líquido por 1 hora. Verifica-se que a germinação, em todos os tratamentos teve início ao redor de 6 dias, após o início do experimento e as taxas máximas de germinação foram obtidas após 17 dias. Os resultados da Figura 2 indicam diferenças significativas entre as taxas de germinação de ambos os tratamentos no início do experimento. Porém, ao final do experimento não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos e as porcentagens máximas de germinação obtidas variaram entre 88,8% (1 hora em nitrogênio líquido) e 89,6% (controle).

Tabela 15. Teor de água de sementes de *Tabebuia pentaphylla* no momento de montagem do experimento de imersão em nitrogênio líquido (-196°C).

Repetição	Teor de água (% MF) ^a
1	7,1
2	7,2
3	7,1
4	7,2
Média	7,1

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada. MF= massa fresca

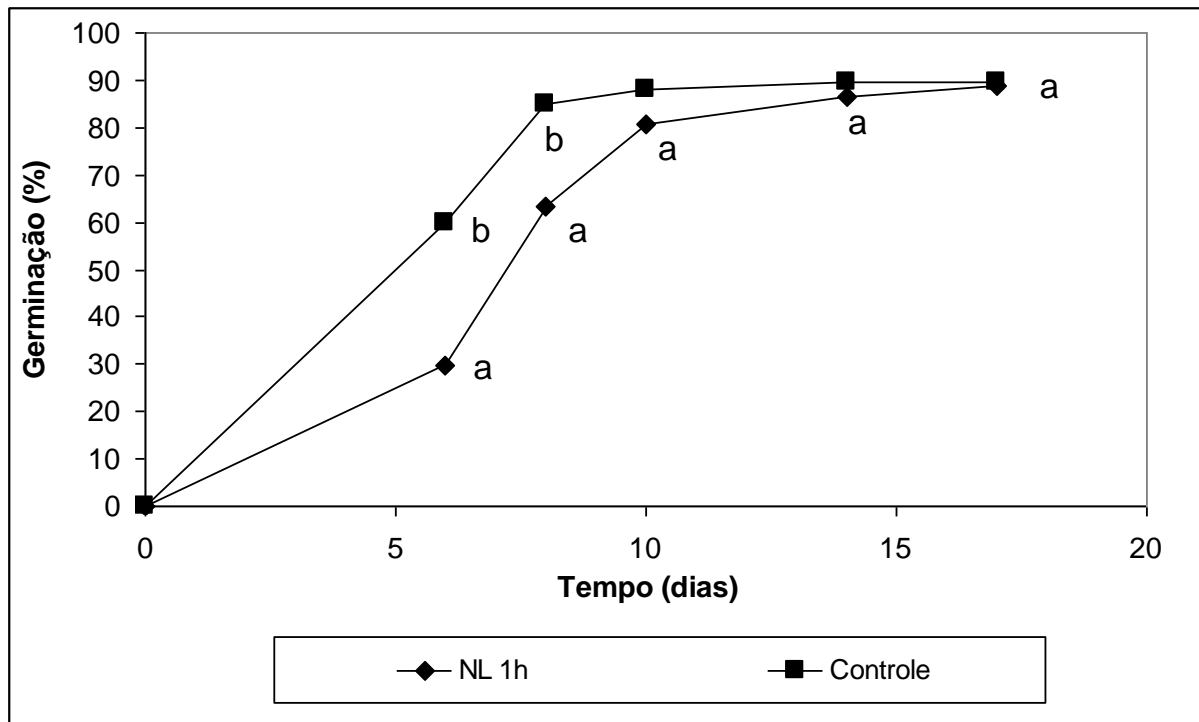


Figura 2. Germinação de sementes de *Tabebuia pentaphylla* imersas em nitrogênio líquido (-196°C) por 1 hora e do controle. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

5.1.7 Efeito da segunda imersão em nitrogênio líquido (-196°C) sobre a viabilidade das sementes de *Tabebuia pentaphylla*

5.1.7.1 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C)

As porcentagens máximas de germinação dos tratamentos em que as sementes foram imersas em nitrogênio líquido, conservadas em temperatura ambiente por 1 e 3 semanas e em seguida submetidas à nova criopreservação estão expressas na Tabela 16. Não foram observadas diferenças significativas entre as taxas máximas de germinação dos tratamentos de criopreservação, seguida do armazenamento por 1 e 3 semanas em temperatura ambiente e da segunda criopreservação (84,0% e 86,4%, respectivamente) em relação ao controle (88,8%), em que as sementes foram imersas por 1 hora em nitrogênio líquido e colocadas para germinar. Também não foram observadas diferenças significativas

entre os tratamentos em que as sementes foram mantidas por 1 e 3 semanas em temperatura ambiente, após a criopreservação, e os demais tratamentos.

Tabela 16. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de *Tabebuia pentaphylla* em temperatura ambiente (25°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.

Tratamentos	Germinação máxima (%) ^a	Índice de velocidade de germinação ^a
NL 1h	88,8 a	8,0 a
NL+1 semana TA	91,2 a	8,4 a
NL+1 semana TA+NL	84,0 a	7,4 a
NL+3 semanas TA	87,2 a	8,3 a
NL+3 semanasTA+NL	86,4 a	7,9 a

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NL= nitrogênio líquido, TA = temperatura ambiente.

5.1.7.2 Efeito do armazenamento em geladeira (5°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C)

As taxas máximas de germinação dos tratamentos de criopreservação seguida do armazenamento por 1 e 3 semanas em geladeira e da segunda criopreservação (84,0% e 85,6%, respectivamente) não diferiram em relação ao controle (88,8%), em que as sementes foram imersas por 1 hora em nitrogênio líquido, conservadas em geladeira por diferentes períodos e em seguida submetidas à nova criopreservação (Tabela 17). Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de velocidade de germinação dos diferentes tratamentos.

Tabela 17. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de *Tabebuia pentaphylla* em geladeira (5°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.

Tratamentos	Germinação máxima (%) ^a	Índice de velocidade de germinação ^a
NL 1h	88,8 a	8,0 b
NL+1 semana GEL	90,4 a	8,5 b
NL+1 semana GEL+NL	84,0 a	6,4 a
NL+3 semanas GEL	85,6 a	7,2 ab
NL+3 semanas GEL+NL	88,8 a	7,8 ab

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NL= nitrogênio líquido, GEL = geladeira.

5.1.7.3 Efeito do armazenamento em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C) após a imersão em nitrogênio líquido (-196°C)

Verifica-se na Tabela 18 que as taxas máximas de germinação, após os armazenamentos das sementes criopreservadas por 1 semana em temperatura ambiente ou geladeira (84,0% em ambos os experimentos) não diferiram significativamente dos tratamentos em que as sementes foram armazenadas em temperatura ambiente ou geladeira por 3 semanas antes da segunda criopreservação (86,4% e 88,8%, respectivamente) e nem do controle (88,8%).

Tabela 18. Efeito do armazenamento de sementes criopreservadas de *Tabebuia pentaphylla* em temperatura ambiente (25°C) ou geladeira (5°C), por períodos de 1 e 3 semanas, seguido da segunda criopreservação, sobre a germinação máxima, alcançada 12 dias após o início do experimento.

Tratamentos	Germinação máxima (%) ^a	Índice de velocidade de germinação ^a
NL 1h	88,8 a	8,0 b
NL+1 semana TA+NL	84,0 a	7,4 a
NL+1 semana GEL+NL	84,0 a	6,4 a
NL+3 semanas TA+NL	86,4 a	7,9 a
NL+3 semanas GEL+NL	88,8 a	7,8 a

^aMédias de 5 repetições com 25 sementes cada seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NL= nitrogênio líquido, TA = temperatura ambiente, GEL = geladeira.

5.1.8 Efeito do armazenamento por 15 meses em freezer (-20°C), geladeira (5°C), congelador (0°C) ou nitrogênio líquido (-196°C) sobre o teor de água, a viabilidade das sementes e o crescimento inicial das plantas de *Tabebuia pentaphylla*

Na Tabela 19 observa-se que o teor de água das sementes armazenadas por 15 meses em geladeira diminuiu significativamente em relação às armazenadas pelo mesmo período, em temperatura ambiente e ao valor observado no momento de montagem do experimento. Entretanto, não houve diferença significativa entre os valores de teor de água das sementes armazenadas em temperatura ambiente e as do controle.

A Figura 3 indica que, após 15 meses de armazenamento em freezer, geladeira e nitrogênio líquido, os valores máximos de germinação foram de 92,8%, 88,0% e 90,4%, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre os mesmos e nem em relação ao controle, realizado no início do experimento (89,6%). Em todos os tratamentos a germinação iniciou ao redor do sexto dia após o início do experimento atingindo a máxima porcentagem após doze dias. As sementes armazenadas nas condições de temperatura ambiente e congelador perderam totalmente a viabilidade após 15 meses de armazenamento.

Tabela 19. Teor de água de sementes de *Tabebuia pentaphylla* no momento de montagem do experimento (controle) e após armazenamento por 15 meses em geladeira (5°C) ou temperatura ambiente (25°C).

Tipos de armazenamento	Teor de água (% MF)^a
Controle	7,14 b
Temperatura ambiente	7,29 b
Geladeira	4,85 a

^aMédias de 5 repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF= massa fresca.

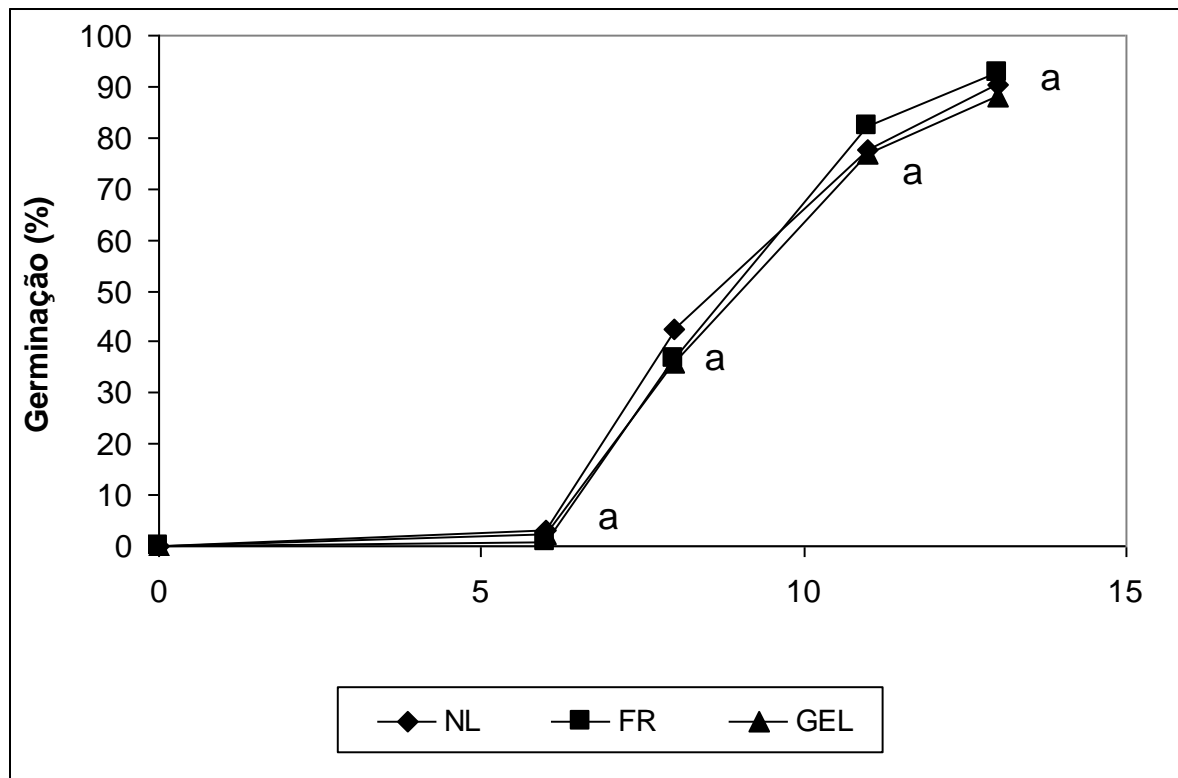


Figura 3. Germinação de sementes de *Tabebuia pentaphylla* armazenadas em freezer (FZ, -20°C), geladeira (GEL, 5°C) e nitrogênio líquido (NL, -196°C) durante 15 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

5.1.9 Efeito de armazenamento em freezer (-20°C), geladeira (5°C), congelador (0°C) ou nitrogênio líquido (-196°C) por 3, 6, 13 e 15 meses sobre a viabilidade das sementes e o crescimento inicial das plantas de *Tabebuia pentaphylla*

Os resultados da Tabela 20 indicam que após 3 meses de armazenamento a taxa máxima de germinação das sementes mantidas em temperatura ambiente foi significativamente menor (42,0%) em relação aos demais tratamentos. Após 6 meses de armazenamento houve redução significativa da germinação das sementes mantidas em temperatura ambiente e congelador (8,0% e 26,0%, respectivamente), sendo que as sementes armazenadas nessas condições por 13 e 15 meses perderam totalmente a viabilidade. Porém, não foram observadas, para cada período de armazenamento e nem entre os períodos de armazenamento, diferenças significativas entre os tratamentos de armazenamento em nitrogênio líquido, freezer e geladeira.

Tabela 20. Taxas máximas de germinação de sementes de *Tabebuia.pentaphylla* armazenadas em diferentes condições por 3, 6, 13 e 15 meses.

Tipos de armazenamento	Tempo (meses)			
	3	6	13	15
Temperatura ambiente	42,0 a	8,0 a	0	0
Nitrogênio líquido	90,0 b	88,0 b	94,0 a	90,4 a
Freezer	93,0 b	95,0 b	88,0 a	92,8 a
Geladeira	88,0 b	91,0 b	92,0 a	88,0 a
Congelador	85,0 b	26,0 a	0	0

^aMédias de 5 repetições seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas em termos de altura, massa seca da parte aérea e massa fresca total das plantas com 30 de idade, originadas a partir de sementes armazenadas por 15 meses em geladeira e freezer (Tabela 21).

Tabela 21. Altura e valores de massa seca e massa fresca de plantas de *Tabebuia pentaphylla* de 30 dias de idade, originadas a partir de sementes armazenadas por 15 meses em freezer (-20°C), geladeira (5°C) e nitrogênio líquido (-196°C).

Tratamentos	Altura (cm) ^a	Massa seca parte aérea (mg) ^a	Massa fresca total (mg) ^a
Freezer	4,79 a	61,46 a	752,66 a
Geladeira	5,11 a	71,93 a	884,33 a
Nitrogênio líquido	4,76 a	62,46 a	721,53 a

^aMédias de no mínimo 15 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2 CULTURA IN VITRO DE *TABEBUIA ROSEOALBA* E *TABEBUIA AVELLANEDAE*

5.2.1 *Tabebuia roseoalba*

5.2.1.1 Germinação *in vitro* de sementes de *Tabebuia roseoalba*

Os resultados da Figura 4 indicam que não houve diferença significativa entre astaxas de germinação *in vitro* de sementes de *T. roseoalba* desinfetadas por 15 ou 30 minutos

em hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo. As porcentagens de germinação observadas foram de 84,0% e 77,3%, respectivamente.

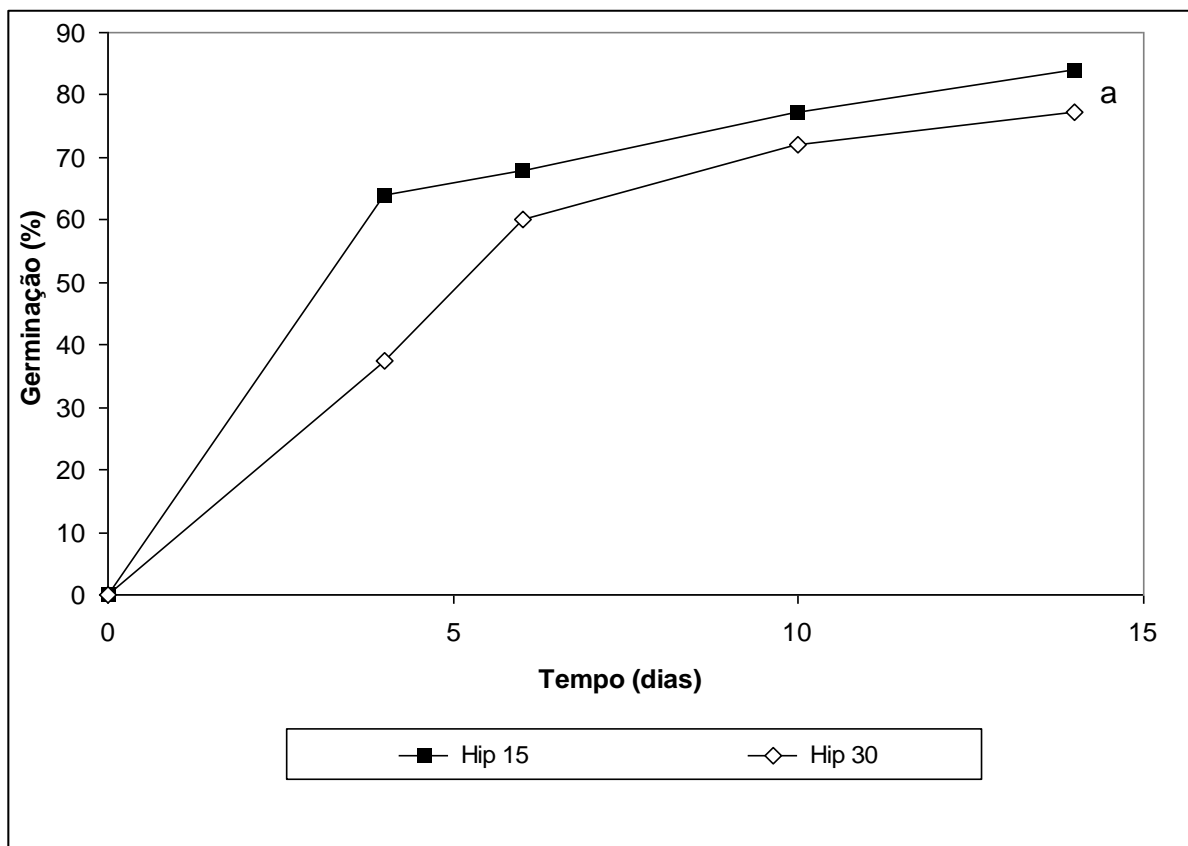


Figura 4. Germinação de sementes de *Tabebuia roseoalba* desinfectadas com hipoclorito de sódio por 15 ou 30 minutos e inoculadas em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitágel. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

5.2.1.2 Análise de crescimento *in vitro* de plântulas de *Tabebuia roseoalba*

A análise do crescimento *in vitro* demonstrada na Tabela 22 indica que os números de nós foliares produzidos por plântula de *Tabebuia roseoalba* de 39 e 52 dias de idade não diferiram estatisticamente entre si. (1,65 a 1,83 nós foliares/plântula). Valores significativamente maiores de nós foliares (3,84 nós foliares/plântula) foram observados após 180 dias de cultivo, sendo superiores aos números de nós foliares produzidos por plântulas de 116 e 123 dias de idade (2,68 e 2,89 nós foliares/plântula, respectivamente).

Tabela 22. Número de nós foliares produzidos por plântulas de *Tabebuia roseoalba* germinadas e mantidas em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, por diferentes períodos de cultivo.

Repetições	Períodos de cultivo (dias)					
	39	45	52	116	123	180
1	1,57	1,77	2,30	2,69	3,05	3,50
2	1,70	1,78	1,80	2,86	2,87	4,04
3	1,67	1,92	1,70	2,82	3,17	4,18
4	1,62	1,92	1,87	2,38	3,10	3,96
5	1,54	1,78	1,48	2,45	2,75	3,80
6	1,80	1,75	1,84	2,92	2,44	3,60
Média ^a	1,65 a	1,82 a	1,83 a	2,68 b	2,89 b	3,84 c

^aMédias de no mínimo 20 repetições seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.1.3 Indução e crescimento de calos de *T. roseoalba*

Os resultados da Tabela 23 indicam que, na ausência de 2,4-D calos foram induzidos na porcentagem de 7,7 a 8,3% em segmentos de hipocótilo e de cotilédone, respectivamente. Em segmentos de cotilédones, calos foram induzidos em 95,8% e 80,7% dos explantes, com 1,25 e 2,5 μM de 2,4-D respectivamente; na concentração de 5 μM de 2,4-D apenas 58,3% dos explantes formaram calos. Em segmentos de hipocótilo as porcentagens de indução de calos variaram entre 91,6% e 100% e ocorreram em todas as concentrações de 2,4-D. Em nenhum tratamento foi observada a formação de ramos e raízes nos explantes.

O 2,4-D promoveu significativamente o crescimento em massa fresca (229 mg) e massa seca (9,8 mg) de calos obtidos a partir de segmentos de cotilédone em relação aos tratamentos em que segmentos de cotilédone ou hipocótilo foram cultivados na presença de 5 μM de 2,4-D (Tabela 24). Explantes de hipocótilo nas concentrações de 1,25 e 2,5 μM de 2,4-D formaram calos com massas frescas de 173,1 e 209 mg, respectivamente, correspondente a 8 e 7,7 mg de massa seca, valores similares aos obtidos para cotilédone, nas mesmas concentrações. Apenas na concentração de 2,4-D de 5 μM os calos obtidos a partir de segmentos de cotilédones apresentaram teor de água significativamente menor (93,4%) do que nos demais tratamento.

Tabela 23. Efeito do 2,4-D sobre a morfogênese *in vitro* em diferentes tipos de explantes de plântulas de *Tabebuia roseoalba* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 7 semanas de cultivo.

2,4-D (μM)	Tipo de explante	Calos (%) ^a	Não responderam (%) ^a
0	Cotilédone	8.3	91.6
	Hipocótilo	7.7	92.3
1.25	Cotilédone	95.8	4.2
	Hipocótilo	91.6	8.3
2.5	Cotilédone	80.7	15.3
	Hipocótilo	100	0
5.0	Cotilédone	58.3	37.5
	Hipocótilo	92.3	7.4

^aValores são proporções de no mínimo 24 repetições.

Tabela 24. Efeito do 2,4-D sobre as massas fresca e seca e sobre o teor de água de calos obtidos a partir de segmentos de cotilédone e hipocótilo de plântulas de *Tabebuia roseoalba* cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 7 semanas de cultivo.

Explante	2,4-D (μM)	MF (mg) ^a	MS (mg) ^a	Teor de água (%MF) ^a
Cotilédone	1,25	229,0 c	9,8 c	95,1 b
Cotilédone	2,5	180,5 abc	6,9 abc	95,5 bc
Cotilédone	5,0	87,3 a	5,4 ab	93,4 a
Hipocótilo	1,25	173,1 abc	8,0 bc	95,1 bc
Hipocótilo	2,5	209,0 abc	7,7 bc	96,2 c
Hipocótilo	5,0	91,9 ab	3,3 a	96,2 c

^aMédias de no mínimo 11 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca, MS = massa seca.

5.2.2 *Tabebuia avellanadae*

5.2.2.1 Germinação *in vitro* de sementes de *Tabebuia avellanadae*

A Figura 15 mostra o efeito da desinfecção (15 e 30 minutos) utilizando hipoclorito de sódio sobre a germinação *in vitro* de sementes de *Tabebuia avellanadae*, não ocorrendo diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. As porcentagens de germinação foram de 80,63% e 96,67%, respectivamente.

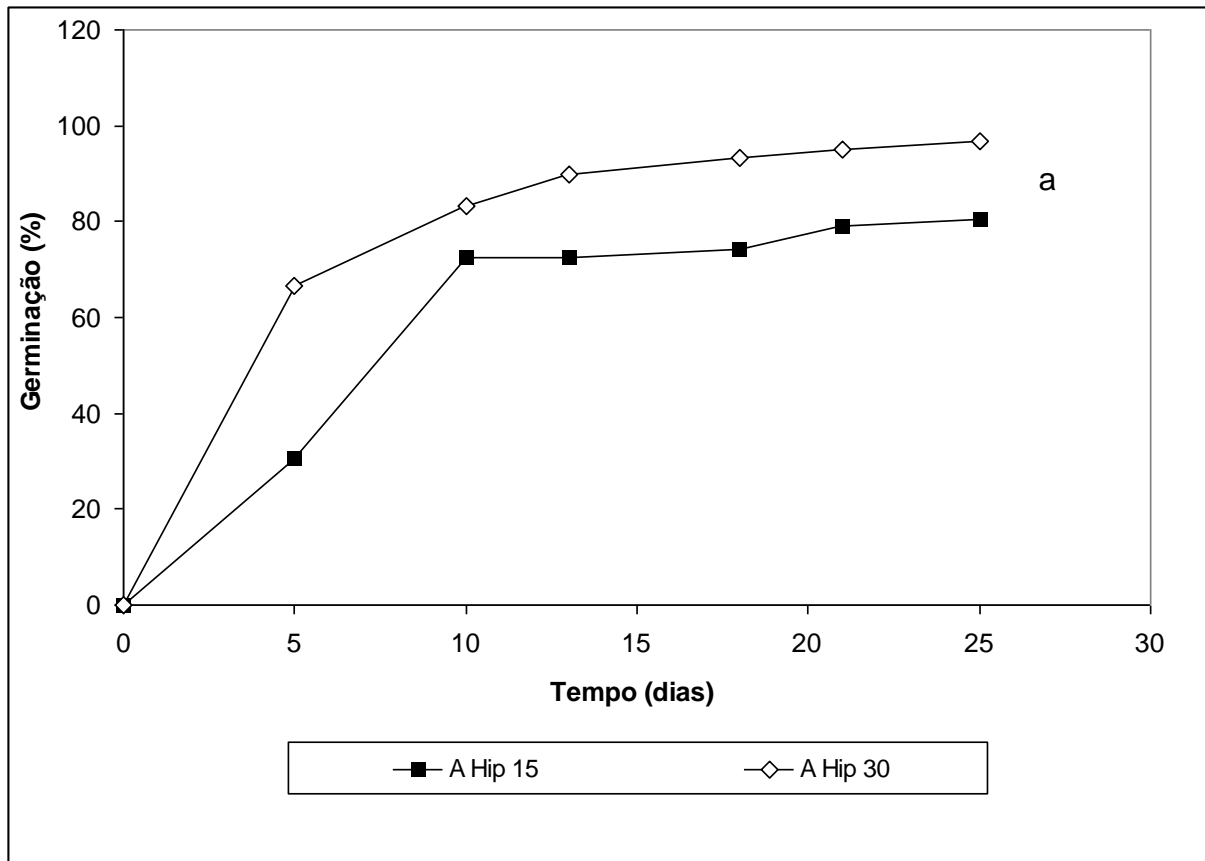


Figura 5. Germinação de sementes de *Tabebuia avellanedae*, após diferentes períodos (15 e 30 minutos) de desinfecção em hipoclorito de sódio e inoculadas em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitigel. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.2.2 Análise de crescimento *in vitro* de plântulas de *Tabebuia avellanedae*

A análise do crescimento *in vitro* demonstrada na Tabela 22 indica que o número de nós foliares produzidos por plântula de *Tabebuia avellanedae* de 38 e 44 dias de idade não diferiram estatisticamente entre si. (2,05 a 2,40 nós foliares/plântula). Valores significativamente maiores de nós foliares (3,59 e 3,61 nós foliares/plântula) foram observados após 115 e 122 dias de cultivo, sendo superiores aos números de nós foliares produzidos por plântulas de 50 dias de idade (2,73 nós foliares/plântula).

Tabela 25. Número de nós foliares produzidos por plântulas de *Tabebuia avellanedae* germinadas e mantidas em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, por diferentes períodos de cultivo.

Repetições	Períodos de cultivo (dias)				
	38	44	50	115	122
1	2,38	1,72	2,72	2,41	3,26
2	2,36	2,06	2,66	3,44	3,37
3	2,73	2,61	2,47	4,14	4,21
4	2,45	2,07	3,20	4,38	3,71
5	2,26	1,94	2,81	3,38	3,52
6	2,26	1,93	2,54	3,81	3,63
Média ^a	2,40 ab	2,05 a	2,73 b	3,59 c	3,61 c

^aMédias de no mínimo 20 repetições seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2.2.3 Efeito de citocininas sobre a iniciação de culturas de ramos de *Tabebuia avellanedae*

Os resultados do primeiro experimento realizado para verificar o efeito do BAP sobre a morfogênese *in vitro* de diferentes tipos de explantes indicam que houve indução de ramos em 100% das culturas, independente do tipo de explante, não sendo, contudo, verificada a formação de raízes em nenhum tratamento (Tabela 26). Nas concentrações de 1,25 μM e 2,5 μM de BAP a formação de calos ocorreu em todos os explantes, em frequências variando de 10 a 40 %, exceto para segmentos nodais apicais cultivados com 1,25 μM de BAP. Os maiores valores de massa fresca dos calos foram observados nos tratamentos em que foram utilizados segmentos nodais apicais e cotiledonares com BAP na concentração de 2,5 μM .

Tabela 26. Efeito do BAP sobre a morfogênese de diferentes explantes de plântulas de *Tabebuia avellanedae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 8 semanas.

Explante	BAP (μM)	Ramos (%) ^a	Raízes (%) ^a	Calos (%) ^a	Massa fresca dos calos (mg) ^a
Nó apical	0	100	0	0	*
	1,25	100	0	0	*
	2,50	100	0	40	208
Nó foliar	0	100	0	0	*
	1,25	100	0	10	58
	2,50	100	0	10	94
Nó cotiledonar	0	100	0	0	*
	1,25	100	0	30	71
	2,50	100	0	40	167

^aValores são proporções de 12 repetições. *Tratamentos que não formaram calos.

Os resultados da Tabela 27 indicam que para nó apical a concentração de 2,5 μM de BAP promoveu significativamente o aumento em massa fresca total das culturas, por ter induzido a formação de calos, como observado na Tabela 26. Porém, não foram observadas diferenças significativas, entre as concentrações de BAP, com relação aos outros parâmetros de crescimento. Explantes de segmentos nodais apicais originaram microplantas com 1 a 2,6 ramos por planta, 2,7 a 3,1 nós, 4,6 a 5,3 gemas e com número de folhas por planta variando de 4,7 a 5,7. Para segmentos nodais foliares e cotiledonares não foram observadas diferenças significativas nos valores de massa fresca total das culturas entre os tratamentos com diferentes concentrações de BAP. Explantes de segmentos nodais cotiledonares originaram microplantas com número de ramos por planta significativamente maior (3,3), na concentração de 2,5 μM , mas não foram verificadas diferenças significativas para os demais parâmetros de crescimento analisados. Apresentaram, por planta, de 2,8 a 4,7 nós, 4,6 a 7,7 gemas e 4,6 a 8,8 folhas. Microplantas produzidas a partir de nós foliares apresentaram, por planta, de 1,2 a 2,4 ramos, de 3 a 4,2 nós, de 4 a 7,5 gemas e de 5 a 7,7 folhas. Os valores obtidos para o número de gemas são importantes, pois indicam o potencial de multiplicação, onde cada gema é um propágulo que pode ser utilizado para originar uma nova planta *in vitro*.

Tabela 27. Efeito do BAP sobre o crescimento de culturas de ramos a partir de explantes de plântulas de *Tabebuia avellanae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 8 semanas.

Explante	BAP (μM)	MF total (mg) ^a	Nº. ramos ^a	Nº. nós ^a	Nº. gemas ^a	No. folhas ^a
Nó apical						
	0	60,1 a	1,0 a	3,1 a	4,8 a	4,7 a
	1,25	139,5 ab	1,6 ab	2,7 a	4,6 a	4,7 a
	2,50	288,9 b	2,6 ab	3,1 a	5,3 a	5,7 a
Nó foliar						
	0	131,5 ab	1,2 a	4,2 a	7,5 a	7,7 a
	1,25	135,5 ab	2,4 ab	3,9 a	5,7 a	5,7 a
	2,50	165,0 ab	2,4 ab	3,0 a	4,0 a	5,0 a
Nó cotiledonar						
	0	122,4 ab	1,3 a	2,8 a	4,6 a	4,6 a
	1,25	233,6 b	2,0 ab	3,5 a	5,6 a	6,4 a
	2,50	255,0 b	3,3 b	4,7 a	7,7 a	8,8 a

^aMédias de no mínimo 12 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca.

No segundo experimento realizado para verificar o efeito de BAP sobre o crescimento in vitro das microplantas constatou-se que 42 a 67% dos segmentos nodais foliares inoculados formaram ramos, mas não formaram calos e nem raízes (Tabela 28). Na presença de cinetina houve a formação de ramos em 42 a 75% dos segmentos nodais foliares e em 58 a 75% dos segmentos nodais cotiledonares, mas também não foram observadas culturas com raízes ou calos.

Tabela 28. Efeito do BAP e cinetina sobre a morfogênese de diferentes explantes de plântulas de *Tabebuia avellanedae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 8 semanas.

Citocinina	Explante	Concentrações (μM)	Ramos (%) ^a
BAP	Nó foliar	0	50
		1,25	42
		2,50	50
		5	67
Cinetina	Nó foliar	0	75
		1,25	58
		2,50	67
		5	42
	Nó cotiledonar	0	75
		1,25	58
		2,50	67
		5	75

^aValores são proporções de 12 repetições.

O número de nós por planta, número de gemas e número de folhas não foram influenciados por BAP ou Cinetina e nem pelo tipo de explante utilizado (Tabela 29), já que não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Em todos os tratamentos as microplantas apresentaram um único ramo, o número de nós variou de 1,7 a 2,9, o número de gemas de 4,4 a 6,4 e o número de folhas de 3,4 a 5,4. Pelo número de gemas produzidas verifica-se que a taxa máxima de multiplicação em BAP, a partir de segmentos nodais foliares, foi de 5,8 e em cinetina foi de 6,4, para segmentos nodais cotiledonares.

Tabela 29. Efeito do BAP e cinetina sobre o crescimento de cultura de ramos a partir de diferentes explantes de plântulas de *Tabebuia avellanedae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 8 semanas.

Citocinina	Explante	Concentrações (μM)	Nº. nós ^a	Nº. gemas ^a	Nº. folhas ^a
BAP	Nó foliar	0	1,7 a	4,4 a	3,4 a
		1,25	2,1 a	5,1 a	4,1 a
		2,50	2,3 a	5,7 a	4,5 a
		5	2,5 a	5,8 a	4,8 a
Cinetina	Nó foliar	0	1,7 a	4,4 a	3,4 a
		1,25	2,0 a	5,0 a	4,0 a
		2,50	2,3 a	5,1 a	4,1 a
		5	2,0 a	5,0 a	4,0 a
	Nó cotiledonar	0	1,9 a	4,8 a	3,8 a
		1,25	2,9 a	6,4 a	5,4 a
		2,50	2,7 a	6,3 a	5,3 a
		5	2,3 a	5,5 a	4,6 a

^aMédias de no mínimo 12 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca.

5.2.2.4 Indução e crescimento de calos de *Tabebuia avellanedae*

5.2.2.4.1 Efeito de auxinas e tipos de explante sobre a indução e o crescimento dos calos de *Tabebuia avellanedae*

Os resultados da Tabela 30 revelam que e somente o tratamento controle, sem a adição de auxina, resultou na formação de ramos. As maiores taxas de indução de gemas, de 33% a 67%, também foram observadas no tratamento do controle ou quando baixas concentrações de 1,25 μM ou 2,5 μM dos reguladores ANA ou AIB foram utilizadas, sendo que nesses tratamentos os valores variaram de 17% a 42%. Em nenhum dos tratamentos houve a formação de raízes.

Os calos foram induzidos em todos os tratamentos com auxinas. No tratamento com 2,4-D as taxas de indução de calos variaram entre 75% e 83%, sendo baixa (25%) apenas no tratamento com segmentos nodais foliares cultivados na presença de 2,5 μM de 2,4-D. Nos tratamentos com ANA a maior taxa de indução de calos (92%) foi observada no tratamento

com segmentos nodais cotiledonares e 5,0 μM de ANA. Nos demais tratamentos com ANA foram obtidos valores intermediários de taxas de indução de calos (entre 42% e 67%). Na presença de AIB as maiores taxas de indução de calos de 67% e 75% ocorreram quando segmentos nodais foliares ou cotiledonares foram cultivados com 5,0 μM de AIB. Valores intermediários de taxas de indução de 42% e 50% foram obtidos com segmentos nodais cotiledonares cultivados com 1,25 μM ou 2,5 μM de AIB. As menores taxas de indução de calos (entre 17% e 33%) foram observadas nos tratamentos com segmentos nodais foliares na presença de 1,25 ou 2,5 μM de AIB. No controle, desprovido de auxinas, foi observada a menor taxa de indução de calos (8,5%) apenas no tratamento em que foram utilizados segmentos nodais cotiledonares.

A análise de variância multifatorial dos resultados dos experimentos para verificar o efeito de diferentes tipos de explante e de concentrações de 2,4-D sobre o crescimento dos calos indicou interação significativa entre estes fatores para os parâmetros massa seca e o teor de água dos calos (Tabela 31). Observa-se que, o valor máximo da massa seca total do calo, produzido por explante, foi obtido com segmentos nodais cotiledonares e 1,25 μM de 2,4D (23,1 mg). Contudo, este valor não diferiu significativamente dos demais tratamentos, em que os valores de massa seca dos calos variaram de 17,7 mg a 22,2 mg, exceto quando segmentos nodais foliares foram cultivados com 5 μM de 2,4-D (6,5 mg). Valor superior de teor de água dos calos (96,5%) foi obtido a partir do cultivo de segmentos nodais foliares na presença de 2,5 μM de 2,4D, mas verifica-se que não houve diferença significativa entre este e os valores obtidos nos demais tratamentos, exceto quando segmentos nodais foliares foram cultivados na presença de 5,0 μM de 2,4D (93,0 %).

Tabela 30. Efeito de auxinas sobre a morfogênese *in vitro* de nós foliares e cotiledonares de *Tabebuia avellanedae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

Auxinas	Concentração (µM)	Explante	Calos (%) ^a	Ramos (%) ^a	Gemas (%) ^a
Controle 1	0	NF	0	25	67
		NC	0	33	58
Controle 2	0	NF	0	33	67
		NC	8,5	25	33
2,4-D	1,25	NF	75	0	0
		NC	75	0	0
	2,5	NF	25	0	0
		NC	75	0	0
	5	NF	83	0	0
		NC	83	0	0
ANA	1,25	NF	67	0	17
		NC	42	0	8,5
	2,5	NF	58	0	17
		NC	67	0	8,5
	5	NF	58	0	0
		NC	92	0	0
AIB	1,25	NF	17	0	42
		NC	42	0	17
	2,5	NF	33	0	42
		NC	50	0	8,5
	5	NF	75	0	0
		NC	67	8,5	0

^aValores são proporções de no mínimo 12 repetições. NF= Nó foliar; NC= Nó cotiledonar

Tabela 31. Efeito do 2,4-D sobre a massa seca e o teor de água de calos obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de *Tabebuia avellanedae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

Explante	2,4-D (µM)	MS (mg) ^a	Teor de água (%MF) ^a
NC	1,25	23,1 b	94,1 ab
NC	2,5	22,3 b	94,8 ab
NC	5,0	21,0 ab	94,7 ab
NF	1,25	17,7 ab	94,1 ab
NF	2,5	19,7 ab	96,5 b
NF	5,0	6,5 a	93,0 a

^aMédias de no mínimo 11 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NC= Nó cotiledonar, NF= Nó foliar, MF = massa fresca, MS = massa seca.

As análises estatísticas conduzidas para avaliar o efeito isolado dos fatores tipo de explante e concentrações de 2,4D, para o parâmetro massa fresca dos calos, não indicou diferenças significativas entre os tipos de explantes nas concentrações de 1,25 ou 2,5 µM de 2,4-D e os valores variaram de 352 mg a 489 mg de massa fresca (Tabela 32). Contudo, na

concentração de 5 μM os calos produzidos a partir de segmentos nodais foliares apresentaram massa fresca significativamente menor (98,2 mg) do que aqueles produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares (469,5 mg). As análises do efeito das concentrações de 2,4-D, para cada tipo de explante, indicaram diferença significativa quando foi utilizado segmento nodal cotiledonar, sendo que a massa fresca dos calos produzidos com 1,25 μM de 2,4-D (489,3 mg) foi superior aos valores obtidos nas concentrações de 2,5 μM e 5 μM de 2,4-D (469,5 mg). Quando segmentos nodais foliares foram utilizados como explantes os valores de massa fresca dos calos produzidos na presença de 1,25 μM ou 2,5 μM de 2,4-D foram de 352 mg e 553,6 mg, respectivamente, significativamente superiores ao obtido com 5 μM de 2,4-D (98,2 mg).

Tabela 32. Efeito do 2,4-D sobre a massa fresca de calos (mg) obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de *Tabebuia avellanedae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

Explante	2,4-D (μM) ^a			Média
	1,25	2,5	5,0	
Nó cotiledonar	489,3 Ab	469,5 Aa	469,5 Ba	476,1 A
Nó foliar	352,0 Ab	553,6 Ab	98,2 Aa	334,6 A
Média	420,6 b	511,5 b	283,8 a	

^aMédias de no mínimo 11 repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$) e com teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca e MS = massa seca.

A análise de variância multifatorial dos resultados dos experimentos para verificar o efeito de diferentes tipos de explante e de concentrações de ANA sobre o crescimento dos calos indicou interação significativa entre estes fatores para os parâmetros massa fresca, massa seca e o teor de água dos calos (Tabela 33). Observa-se que o valor máximo da massa fresca total das culturas foi obtido a partir do cultivo do segmento nodal cotiledonar na presença de 2,5 μM de ANA (235,4 mg). Este valor não diferiu significativamente dos valores observados nos tratamentos com segmentos nodais cotiledonares cultivados com 5 μM de ANA e segmentos nodais foliares cultivados com 1,25 μM de ANA, em que as massas frescas dos calos foram de 207,5 e 225,3 mg, respectivamente. Estes valores, contudo, foram superiores aos obtidos nos tratamentos em que segmentos nodais cotiledonares foram cultivados em 1,25 μM de ANA (131,4 mg) e em que segmentos nodais foliares foram cultivados na presença de 2,5 μM ou 5 μM de ANA (73,6 mg e 60,4 mg, respectivamente). Em termos de massa seca, verifica-se que o maior valor observado para os calos iniciados a

partir do cultivo de segmentos nodais cotiledonares em 2,5 μM de ANA (19,1 mg) não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, exceto quando segmentos nodais foliares foram cultivados na presença de 2,5 ou 5 μM de ANA, quando os valores de massa seca dos calos foram de 8,4 mg e 7,7 mg, respectivamente. Para o parâmetro teor de água dos calos, o valor máximo observado (92,0 %) foi a partir de segmentos nodais cotiledonares em 5,0 μM de ANA. Este valor diferiu significativamente dos tratamentos com segmentos nodais cotiledonares com 1,25 μM de ANA (88,6%), e com segmentos nodais foliares com 2,5 μM ou com 5 μM de ANA (88,5% e 86,4%, respectivamente). Porém, não diferiu estatisticamente dos tratamentos com segmentos nodais cotiledonares em 2,5 μM de ANA (91,0 %) e com segmentos nodais foliares em 1,25 μM de ANA (90,0 %).

Tabela 33. Efeito do ANA sobre o crescimento de calos obtidos a partir de cultura de nós foliares e cotiledonares de *Tabebuia avellanedae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

Explante	ANA (μM)	MF (mg) ^a	MS (mg) ^a	Teor de água (%MF) ^a
NC	1,25	131,4 a	14,7 b	88,6 ab
NC	2,5	235,4 b	19,1 b	91,0 bc
NC	5,0	225,3 b	17,2 b	92,0 c
NF	1,25	207,5 b	18,8 b	90,0 bc
NF	2,5	73,6 a	8,4 a	88,5 ab
NF	5,0	60,4 a	7,7 a	86,4 a

^aMédias de no mínimo 11 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NC= Nó cotiledonar, NF= Nó foliar, MF = massa fresca, MS = massa seca.

A análise de variância multifatorial dos resultados dos experimentos para verificar o efeito de diferentes tipos de explante e de concentrações de AIB sobre o crescimento dos calos indicou interação significativa entre estes fatores para o parâmetro teor de água (Tabela 34). Verifica-se, que os maiores valores de teor de água 91,2% e 91,4 % foram obtidos com segmentos nodais cotiledonares em 1,25 μM de AIB e por segmentos nodais foliares cultivados em 5,0 μM de AIB, respectivamente. Estes valores alcançados não diferiram significativamente dos tratamentos com segmentos nodais cotiledonares em 2,5 μM e 5,0 μM de AIB, e dos valores obtidos para os segmentos nodais foliares cultivados em 1,25 μM de AIB. O menor valor de teor de água observado foi de 86,3% no tratamento com segmentos nodais foliares cultivados em 2,5 μM de AIB e este valor também não diferiu significativamente do tratamento com segmentos nodais cotiledonares cultivados em 2,5 μM

ou 5,0 μM de AIB (89,2% e 89,7%), e do tratamento com segmentos nodais foliares cultivados na presença de 1,25 μM de AIB (89,7%).

Tabela 34. Efeito do AIB sobre o teor de água de calos obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de *Tabebuia avellanadae* cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

Explante	AIB (μM)	Teor de água (%MF)^a
NC	1,25	91,2 b
NC	2,5	89,2 ab
NC	5,0	89,7 ab
NF	1,25	89,7 ab
NF	2,5	86,3 a
NF	5,0	91,4 b

^aMédias de no mínimo 11 repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NC= Nó cotiledonar, NF= Nó foliar, MF = massa fresca.

As análises estatísticas conduzidas para avaliar o efeito isolado dos fatores tipo de explante e concentrações de AIB, para o parâmetro massa fresca dos calos, não indicou diferenças significativas entre os tipos de explantes, para cada concentração de AIB, e nem entre as concentrações de AIB, para cada tipo de explante (Tabela 35). Os valores de massa fresca dos calos variaram de 112,6 mg a 161,8 mg, para calos produzidos a partir de segmentos nodais cotiledonares, e de 38,5 mg a 99 mg, para calos produzidos a partir de segmentos nodais foliares. Para o parâmetro massa seca dos calos, contudo, houve diferença significativa entre os explantes apenas na concentração de 5,0 μM de AIB, sendo o valor obtido para segmento nodal cotiledonar superior (11,7 mg) ao obtido para segmento nodal foliar (5,6 mg). Não houve diferença significativa entre as concentrações de AIB, para cada tipo de explante e os valores de massa seca variaram de 11 mg a 14 mg, para segmentos nodais cotiledonares, e de 4 a 11,7 mg, para segmentos nodais foliares.

Tabela 35. Efeito do AIB sobre as massas fresca e seca de calos obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de *Tabebuia avellanadae* cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

Explante	AIB (μM) ^a			Média
	1.25	2.5	5.0	
	MF dos calos (mg)			
NC	161,8 Aa	112,6 Aa	115,6 Aa	130
NF	38,5 Aa	88,5 Aa	99 Aa	75,3
Média	100,2	100,6	107,3	
	MS dos calos (mg)			
NC	14 Ba	11 Aa	11,7 Ba	12,2
NF	4 Aa	11,7 Aa	5,6 Aa	7,1
Média	9	11,3	8,6	

^aMédias de no mínimo 11 repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$) e com teste de Tukey ($p \leq 0,05$). NC= Nó cotiledonar, NF= Nó foliar, MF = massa fresca e MS = massa seca.

A Tabela 36 mostra os resultados da distribuição de frequência (%) de classes de intervalos de massa seca de calos obtidos a partir de segmentos nodais foliares e cotiledonares. Os dados indicam que nas menores concentrações de 2,4-D (1,25 μM e 2,5 μM) foram produzidos calos na maioria das classes de intervalos de massa seca, inclusive nas classes entre 31 mg e 40 mg e entre 41 mg e 50 mg, enquanto que com o AIB não foram produzidos calos nessas classes de intervalos de massa seca e com o ANA a máxima classe de intervalos de massa seca observada foi entre 31 mg e 40 mg. Nos diferentes tratamentos utilizando-se as auxinas ANA e AIB, as maiores porcentagens dos calos produzidos se concentraram nas menores classes (entre 0 mg e 10 mg e entre 11 mg e 20 mg), ou seja, na presença desses reguladores a maior porcentagem dos calos produzidos apresentaram massas secas de no máximo 20 mg, enquanto que, na presença das menores concentrações de 2,4-D e quando foram utilizados segmentos nodais cotiledonares como explante, 55% dos calos produzidos apresentaram massa seca maior do que 21 mg, sendo que apenas segmentos nodais cotiledonares foram capazes de produzir calos na classe de intervalo entre 41 mg e 50 mg. Com 5 μM de 2,4-D apenas segmentos nodais cotiledonares produziram calos nas classes de 21 mg a 30 mg e de 31 mg a 40 mg de massa seca. Na presença de ANA apenas 38% dos calos produzidos apresentaram massas secas maiores que 21 mg e com 1,25 μM e 5 μM de AIB 100% dos calos produzidos a partir de segmentos nodais foliares apresentaram massa seca na classe entre 0 e 10 mg.

Tabela 36. Efeito de auxinas sobre a distribuição de frequência (%) de classes de intervalos de massa seca de calos obtidos a partir de nós foliares e cotiledonares de *Tabebuia avellaneda* cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

Auxinas	Concentração (µM)	Explante	Classes de massa seca (mg)				
			0 -10	11-20	21-30	31-40	41-50
2,4-D	1,25	NC	22	22	22	11	22
		NF	44	11	33	11	0
	2,5	NC	33	11	33	11	11
		NF	0	67	33	0	0
	5,0	NC	40	0	20	40	0
		NF	90	10	0	0	0
ANA	1,25	NC	14	86	0	0	0
		NF	25	38	13	25	0
	2,5	NC	25	38	25	13	0
		NF	71	29	0	0	0
	5,0	NC	18	64	0	18	0
		NF	86	14	0	0	0
AIB	1,25	NC	0	100	0	0	0
		NF	100	0	0	0	0
	2,5	NC	71	14	14	0	0
		NF	50	50	0	0	0
	5,0	NC	50	38	13	0	0
		NF	100	0	0	0	0

^aValores são proporções de no mínimo 12 repetições. NF= Nó foliar; NC= Nó cotiledonar

5.2.2.4.2 Efeito de tipos de explantes e 2,4-D sobre o crescimento de calos de *Tabebuia avellaneda*

Os resultados da Tabela 37 indicam que, na concentração de 1,25 µM, o efeito do 2,4-D na indução de calos se mostrou mais efetivo nos explantes segmentos nodais cotiledonares, segmentos nodais foliares e segmentos de hipocótilo, com taxas de indução acima de 92% em relação aos demais explantes (segmento cotiledonar e foliar). Em 2,5 µM de 2,4-D as maiores taxas de formação de calos (acima de 92%) foram observadas com segmentos nodais cotiledonares e segmentos de hipocótilo, enquanto que, para segmento nodal foliar, segmento cotiledonar e segmentos foliares as taxas de indução de calos observadas foram abaixo de 35%. Em nenhuma das concentrações de 2,4-D testadas houve organogênese (formação de ramos e/ou raízes) nos diferentes tipos de explantes, exceto no controle, desprovido de 2,4-D, em que houve a formação de ramos maiores que 1 cm, a partir de segmentos nodais cotiledonares e foliares (taxas de 40% e 30%, respectivamente). No

controle houve indução de calos somente no explante hipocótilo, com taxa de indução de 31%.

Tabela 37. Efeito do 2,4-D sobre a morfogênese *in vitro* em diferentes tipos de explantes de *Tabebuia avellanedae* cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

2,4-D (μM)	Explante	Calos (%) ^a	Ramos (%) ^a
0	Cotilédone	0	0
	Folha	0	0
	Nó cotiledonar	0	40(>1cm)
	Nó foliar	0	30(<1cm)
	Hipocótilo	31	0
1,25	Cotilédone	42	0
	Folha	17	0
	Nó cotiledonar	92	0
	Nó foliar	100	0
	Hipocótilo	100	0
2,5	Cotilédone	35	0
	Folha	35	0
	Nó cotiledonar	100	0
	Nó foliar	8,5	0
	Hipocótilo	92	0

^aValores são proporções de no mínimo 11 repetições.

A análise de variância multifatorial dos resultados dos experimentos para verificar o efeito de diferentes tipos de explante e de concentrações de 2,4-D sobre o crescimento dos calos indicou interação significativa entre estes fatores para os parâmetros massa fresca, massa seca e teor de água (Tabela 38). Os maiores valores observados (402,6 mg e 373,1 mg), em termos de massa fresca dos calos, foram para os tratamentos em que segmentos de hipocótilo foram cultivados em 1,25 μM ou 2,5 μM de 2,4-D. Estes valores foram significativamente superiores em relação aos obtidos para segmentos foliares cultivados em 2,5 μM de 2,4-D (45,9 mg) mas não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Para o parâmetro massa seca dos calos, o maior valor (28,8 mg) foi obtido quando segmentos de cotilédones foram cultivados em 1,25 μM de 2,4-D, sendo que foram detectadas diferenças significativas entre este valor e os observados para todos os tratamentos com 2,5 μM de 2,4-D (de 5 mg a 17,5 mg) e para segmentos nodais foliares cultivados em 1,25 μM de (13,5 mg). Mas este valor não diferiu significativamente dos valores observados nos tratamentos com segmentos nodais cotiledonares (20,6 mg) e segmentos de hipocótilo (19,3 mg) 1,25 μM de 2,4-D. Em termos de teor de água dos calos, o tratamento realizado com segmentos de cotilédones cultivados em 1,25 μM de 2,4-D produziu calos com o menor teor de água

(86,5%) e diferiu significativamente dos demais tratamentos, exceto quando segmentos foliares foram cultivados em 2,5 μM de 2,4-D (88,1%). Os demais tratamentos apresentaram teores de água superiores a 93,7%.

Tabela 38. Efeito do 2,4-D sobre o crescimento de calos obtidos a partir da cultura de diferentes tipos de explantes de *Tabebuia avellanadae* cultivados em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

2,4-D (μM)	Explante	MF (mg) ^a	MS (mg) ^a	Teor de água(%MF) ^a
1,25	Nó cotiledonar	395,9 ab	20,6 bc	94,6 c
	Nó foliar	255,8 ab	13,5 ab	94,6 c
	Cotilédone	320,5 ab	28,8 c	86,5 a
	Hipocótilo	402,6 b	19,3 bc	94,7 c
2,5	Nó cotiledonar	271,7 ab	12,4 ab	94,6 c
	Nó foliar	191,8 ab	10,7 ab	94,1 c
	Cotilédone	189,5 ab	9,1 ab	93,7 bc
	Folha	45,9 a	5,0 a	88,1 ab
	Hipocótilo	373,1 b	17,5 ab	94,6 c

^aMédias de no mínimo 11 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca e MS = massa seca.

A Tabela 39 mostra os resultados da distribuição de frequência (%) de classes de intervalos de massa seca de calos obtidos a partir de diferentes tipos de explantes cultivados em diferentes concentrações de 2,4-D. Os dados indicam que o explante segmento foliar produziu 100% dos calos com massas secas entre 0 mg e 10 mg, em ambas as concentrações de 2,4-D (1,25 μM e 2,5 μM). O máximo valor de classe de massa seca observado para os calos originados a partir dos segmentos cotiledonares e segmentos nodais foliares foi entre 21 e 30 mg. Apenas os explantes de segmentos nodais cotiledonares cultivados com 1,25 μM de 2,4-D produziram 45% dos calos com massas secas acima de 21 mg, sendo que 27% dos calos tiveram mais que 31 mg de massa seca. Contudo, na presença de 2,5 μM de 2,4-D, apenas 8,5% dos calos apresentaram massa seca acima de 31 mg. Segmentos de cotilédones na presença de 1,25 μM de 2,4-D produziram 40% dos calos com massa seca entre 41 mg e 50 mg e segmentos de hipocótilo produziram 41% dos calos com massas secas entre 21 e 40 mg.

Tabela 39. Efeito do 2,4-D sobre a distribuição por frequência (%) de classes de intervalos de massa seca de calos obtidos a partir de cultura de diferentes tipos de explantes de *Tabebuia avellanadae*, originadas em meio Murashige e Skoog, semi-sólido, suplementado com 2% (m/v) de sacarose e 0,2% (m/v) de fitagel, após 10 semanas de cultivo.

2,4D (μM)	Explante	Classes de massa seca (mg) ^a				
		0-10	11-20	21-30	31-40	41-50
1,25	Nó cotiledonar	27	27	18	18	9
	Nó foliar	38	54	8,5	0	0
	Cotilédone	20	20	20	0	40
	Folha	100	0	0	0	0
	Hipocótilo	21	38	33	8,5	0
2,5	Nó cotiledonar	58	25	8,5	0	8,5
	Nó foliar	48	48	4,5	0	0
	Cotilédone	75	13	13	0	0
	Folha	100	0	0	0	0
	Hipocótilo	41	18	27	14	0

^aValores são proporções de no mínimo 12 repetições.

5.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA DE CALOS DE *TABEBUIA AVELLANEDAE*

5.3.1 Análise dos constituintes do extrato hidroalcoólico de calos de *Tabebuia avellanadae*

Calos de *Tabebuia avellanadae* foram submetidos a uma extração com etanol e o extrato hidroalcoólico resultante foi analisado por eletroforese capilar. A Figura 7 mostra, no eletroferograma, o perfil dos constituintes do extrato hidroalcoólico dos calos. Neste eletroferograma podemos observar que a cultura de calos produz uma complexa mistura de metabólitos mostrando a presença de um composto majoritário em 2,9 min. A Figura 8 mostra o perfil dos constituintes do extrato hidroalcoólico da casca de *Tabebuia avellanadae* que é apresentado para comparação. No perfil da cascas é possível identificar a presença majoritária de ácido rosmarínico (1), ácido verátrico (2), ácido anísico (3) e lapachol (Figura 6) (4). Comparando-se os eletroferogramas do extrato hidroalcoólico da casca (Figura 8) com o eletroferograma do extrato hidroalcoólico dos calos (Figura 7) observa-se que os compostos identificados na planta adulta estão ausentes na cultura de calos. No entanto observa-se uma predominância de metabólitos na região de deslocamento de 2-3 min que poderiam ser postulados como precursores daqueles compostos. Além disso, no eletroferograma dos calos

(Figura 7) observam-se alguns metabólitos minoritários cujo deslocamento é compatível com a presença de derivados do lapachol. No entanto esta hipótese deverá ser confirmada através de análises mais precisas comparadas com os padrões específicos.

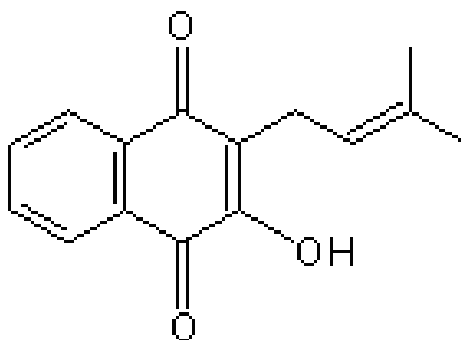


Figura 6. Fórmula do lapachol.

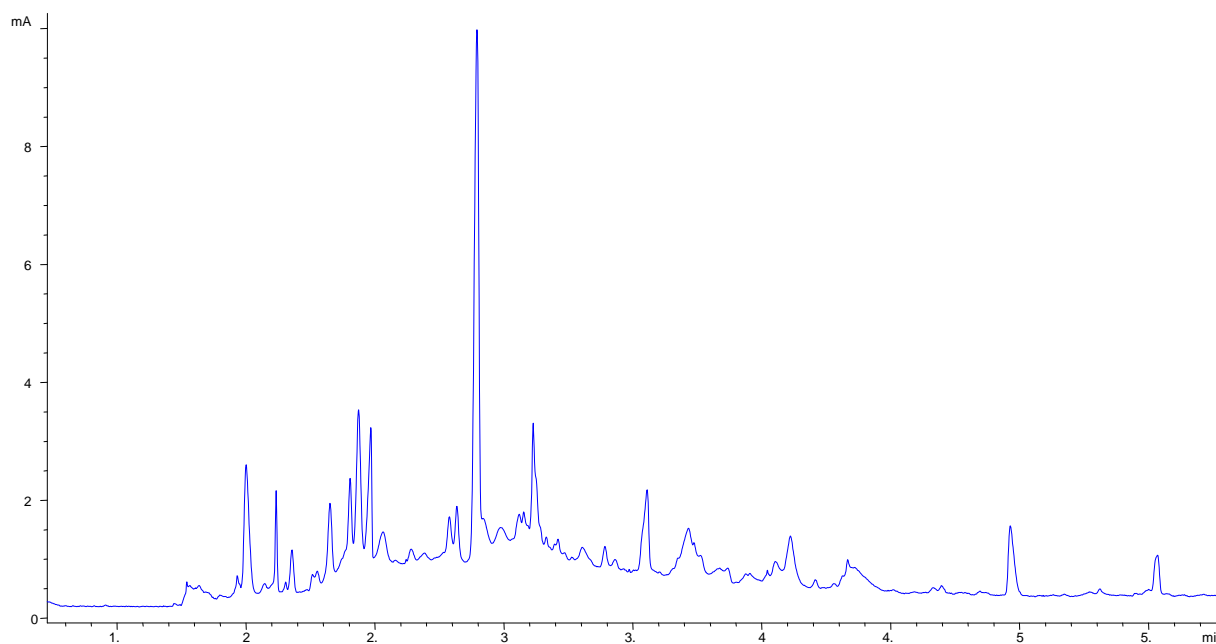


Figura 7. Eletroferograma do extrato hidroalcoólico de calos de *Tabebuia avelanadae*.

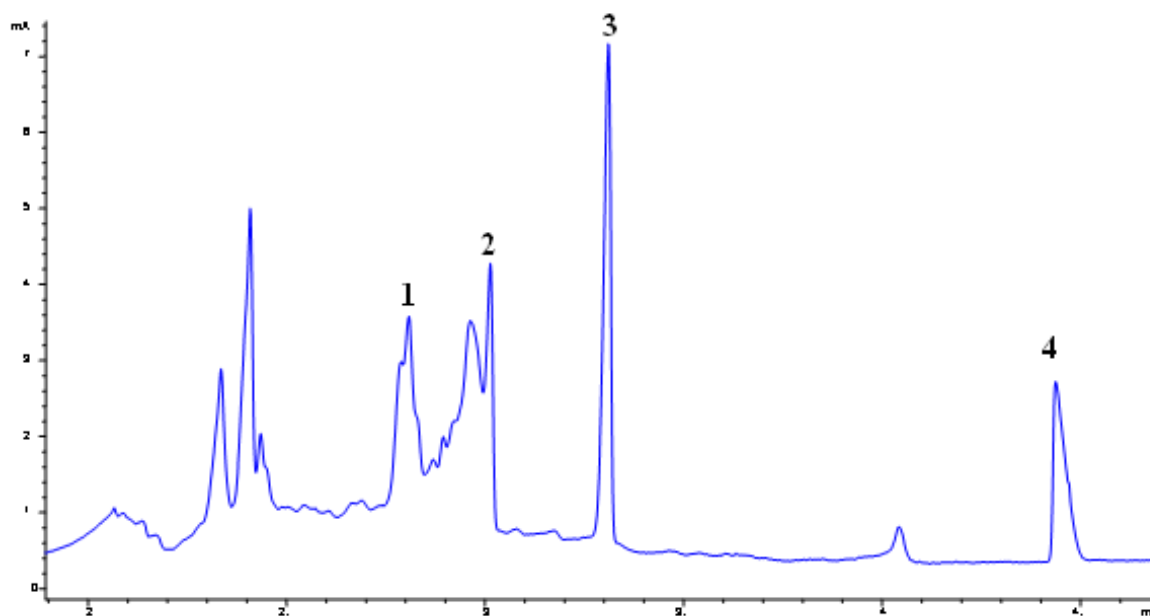


Figura 8. Eletroferograma do extrato hidroalcoólico da casca de *Tabebuia avellanedae*.

5.4.2 Análise dos constituintes voláteis de calos de *Tabebuia avellanedae*

Amostras frescas de calos de *Tabebuia avellanedae* foram submetidas ao procedimento de microextração em fase sólida –SPME em “headspace” com fibra PDMS e analisadas num sistema de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas – CGAR-EM. A Figura 9 mostra o cromatograma de íons totais para o perfil de componentes voláteis dos calos onde foram detectados cinco picos.

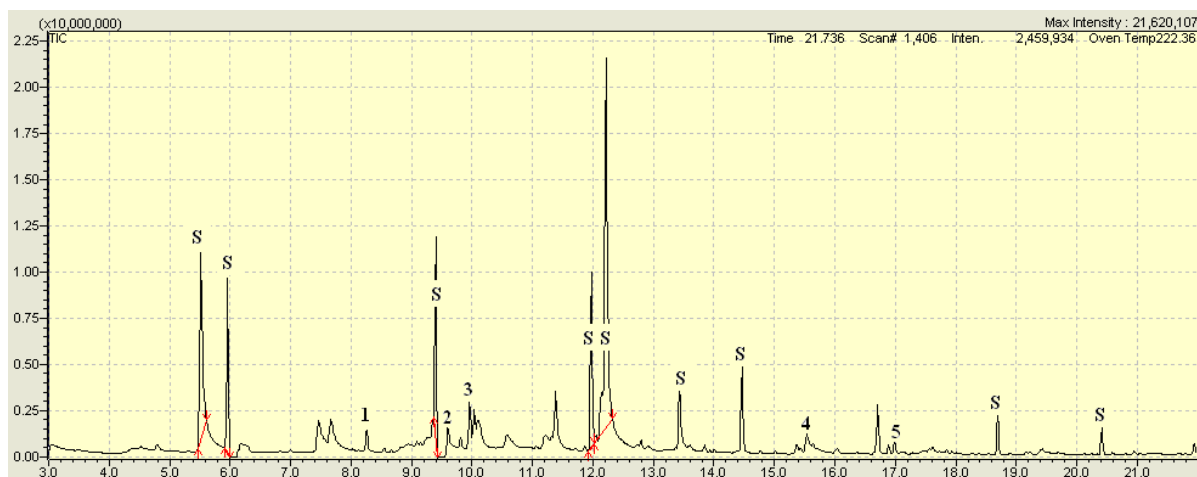
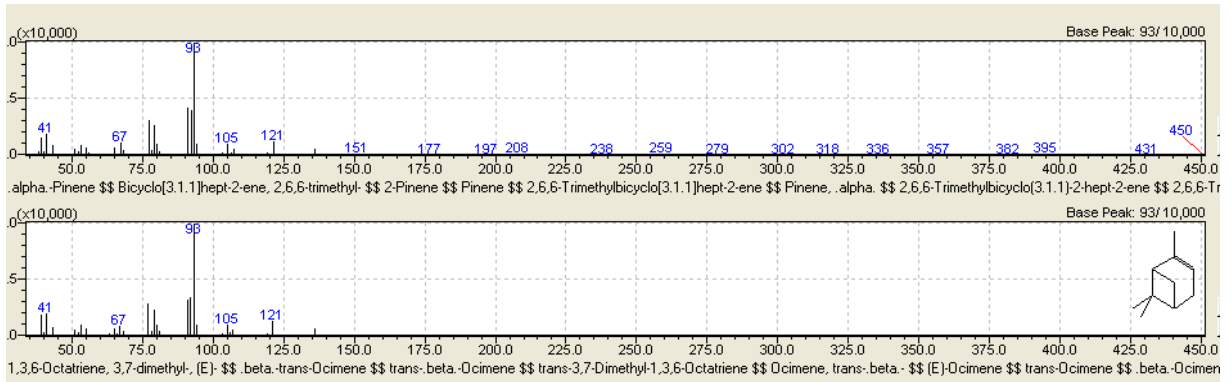


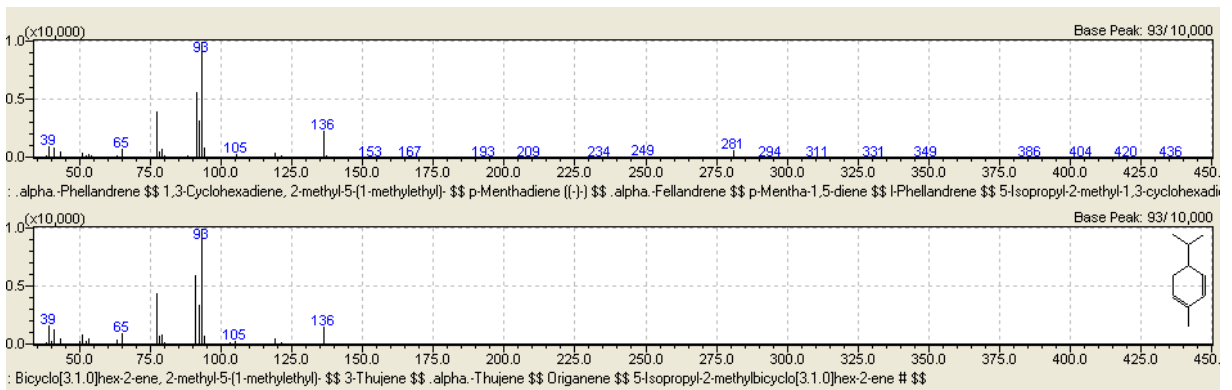
Figura 9. Cromatograma de íons totais dos constituintes voláteis de calos de *Tabebuia avellanedae*. S = fragmentos de siloxano despreendidos da fibra PDMS.

A análise dos espectros de massas de cada pico presente no cromatograma de íons totais, juntamente com seus índices de retenção e comparação com a biblioteca de massas NIST, permitiu a identificação de cinco componentes voláteis, conforme mostra a Figura 10.

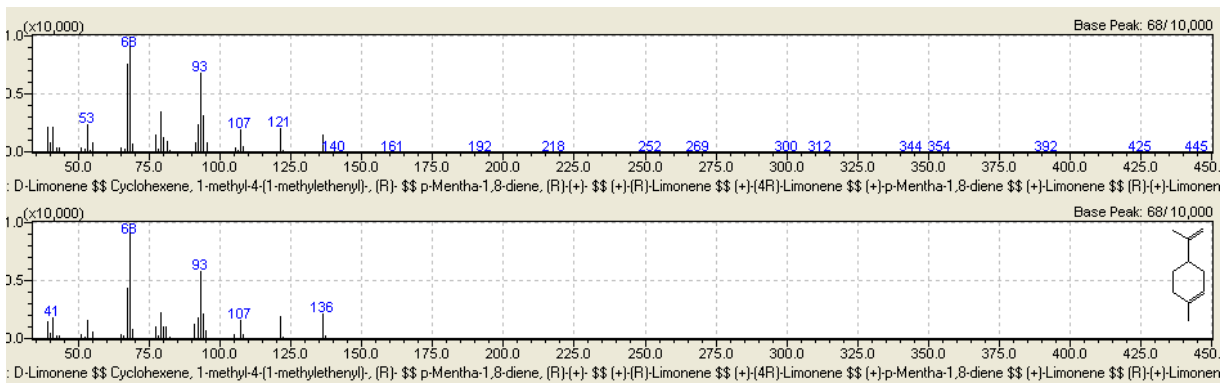
Composto 1 TR = 8,3 min.



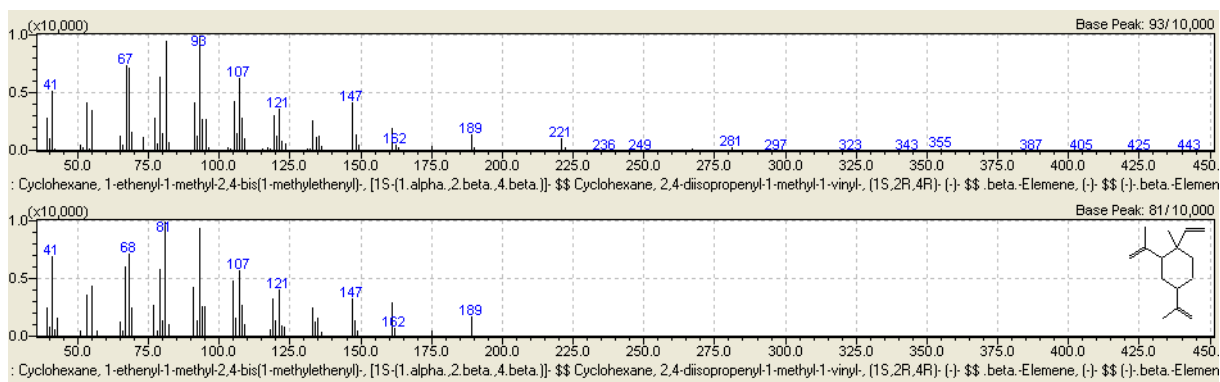
Composto 2 TR = 9,6 min



Composto 3 TR= 10 min



Composto 4 TR = 15,6 min.



Composto 5 TR = 17,0 min.

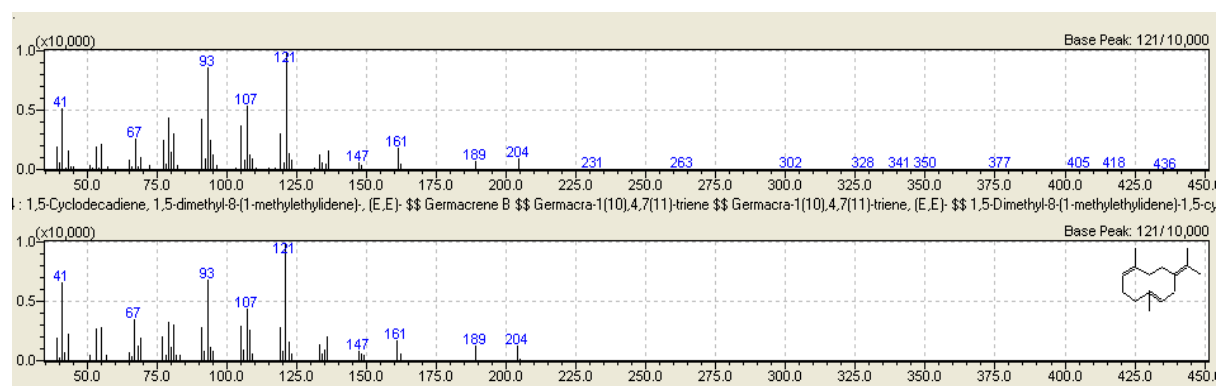


Figura 10. Espectros de massas dos constituintes voláteis identificados no cromatograma de íons totais da SPME de calos de *Tabebuia avellanadae*. Espectro A – espectro composto. Espectro B – provável composto fornecido pela biblioteca NIST

5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DE CALOS

Os calos de *T. avellanadae* foram caracterizados em dois estágios de desenvolvimento: jovem e maduro. Os calos formados apresentavam predominantemente em sua superfície a conformação estrutural de aspecto globular. Constituídos de aglomerados celulares, friáveis e translúcidos.

As células formadoras de calos foram caracterizadas como indiferenciadas. São células grandes de formato variável com diâmetros e comprimentos diferentes, e encontram-se agregadas ou livres. Estas apresentaram paredes celulares delgadas (com cerca de 0,4 μm), presença de núcleo e nucléolo, citoplasmas periféricos em decorrência de um vacúolo principal que ocupa a maior parte no meio intracelular e conseqüentemente deslocando o citoplasma para a periferia.

Os resultados obtidos com os testes citoquímicos para proteínas totais, polissacarídeos ácidos e neutros demonstraram pouca variação entre calos maduros quando comparados aos calos jovens. A caracterização estrutural de calos obtida com auxílio de microscopia óptica (MO) foi demonstrada a seguir nas Figuras 11, 12 e 13. As reações descritas para as células constituintes dos calos foram de acordo com a análise citoquímica utilizada. As amostras quando tratadas com azul de toluidina AT-O (Figuras 11-A/B, 12-A/B/D, 13-C), reagiram metacromaticamente revelando a natureza polissacarídica sulfatada em regiões de matriz extracelular da parede celular. As setas na Figura 12-A indicam regiões metacromáticas distintas, provavelmente advindas de parte do explante inoculado. Na figura 12-B a seta possivelmente evidencia polissacarídeos neutros, pelas região ortocromática. E as setas em 12-D sugerem a presença de tricomas tectores unicelulares de extremidade afilada.

Quando as secções dos calos foram submetidas à reação com o PAS, os citoplasmas das células reagiram positivamente (Figuras 11-D, 12-C, 13-D). A reação ocorreu com os polissacarídeos neutros, especialmente com os numerosos grãos de amido, a principal substância de reserva. A quantidade de grânulos de amido aumentou nas células dos calos maduros, e estes apresentaram uma distribuição heterogênea (Figuras 12-C, 13-D). As paredes celulares também reagiram positivamente indicando a presença de celulose como componente estrutural (Figuras 11-D, 12-C, 13-D).

Quando submetida à reação de CBB (Figuras 11-C, 12-D/F e 13-A/B) foi visualizada a delimitação das células de calos, e evidenciada a presença de um grande núcleo com um ou dois nucléolos. Reagiram positivamente proteínas encontradas principalmente na forma de granulações dispersas no citoplasma e como agregados protéicos no núcleo. As setas da Figura 11-C demonstram grãos de amido que não foram corados com CBB. Na maioria das células os núcleos foram observados no citoplasma periférico como regiões salientes que se projetam no vacúolo (Figuras 11-C, 12-D/F e 13-B). Os citoplasmas das diferentes células, tanto dos calos jovens quanto dos calos maduros, reagiram de forma homogênea e com distribuição preferencialmente periférica.

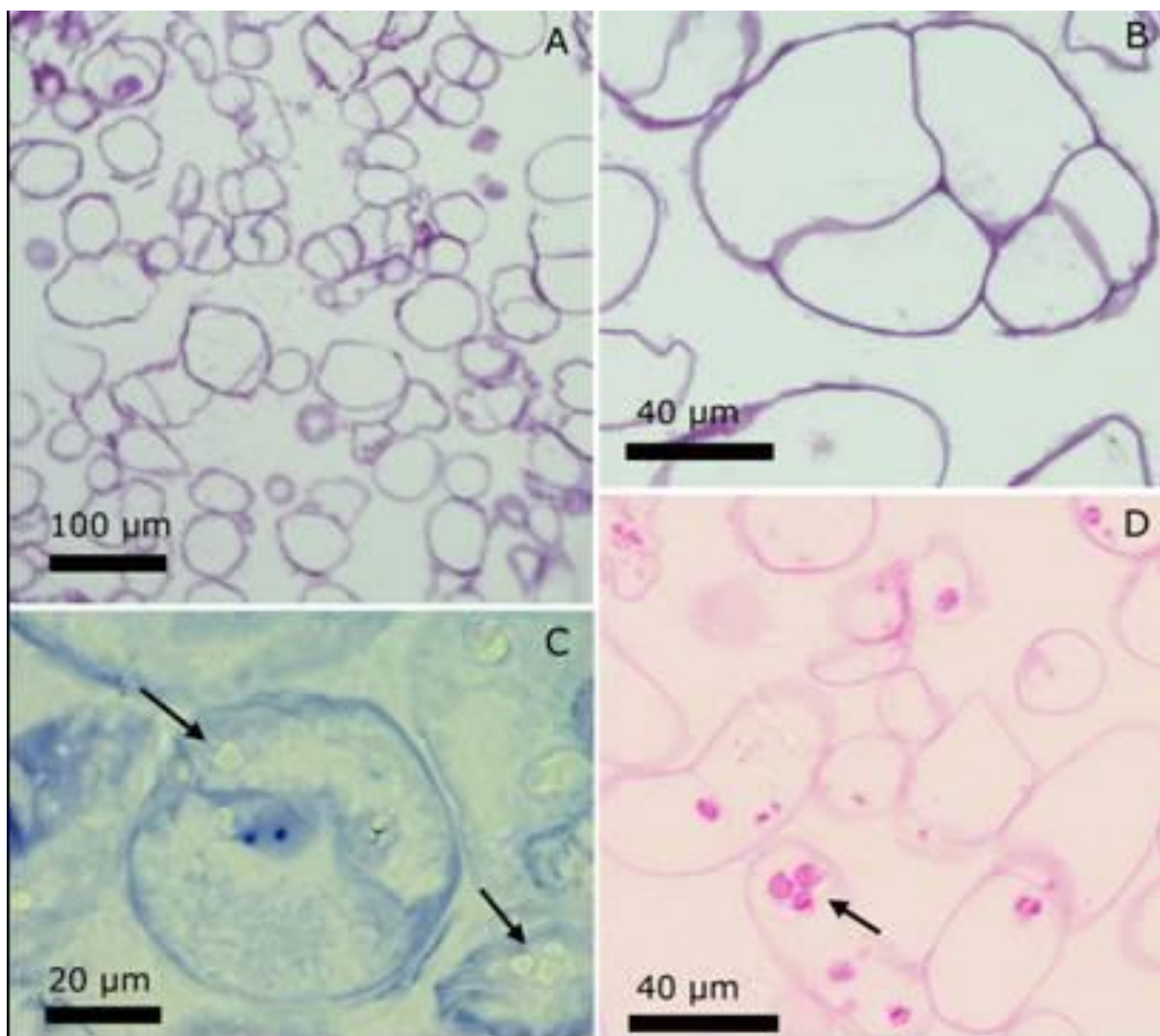


Figura 11. Caracterização citoquímica de calos jovens (20 dias) de *Tabebuia avellanedae* (8 meses). [A] Grupo de células coradas com ao AT-O com reação metacromática na parede celular.. [B] Detalhe de um agregado celular corado com AT-O Amiloplastos não corados (setas) [C] Células coradas com CBB mostrando núcleo com dois nucléolos. [D] Celulas PAS positivas com poucos amiloplastos (seta) e marcadas na parede celular para polissacarídeos neutros.

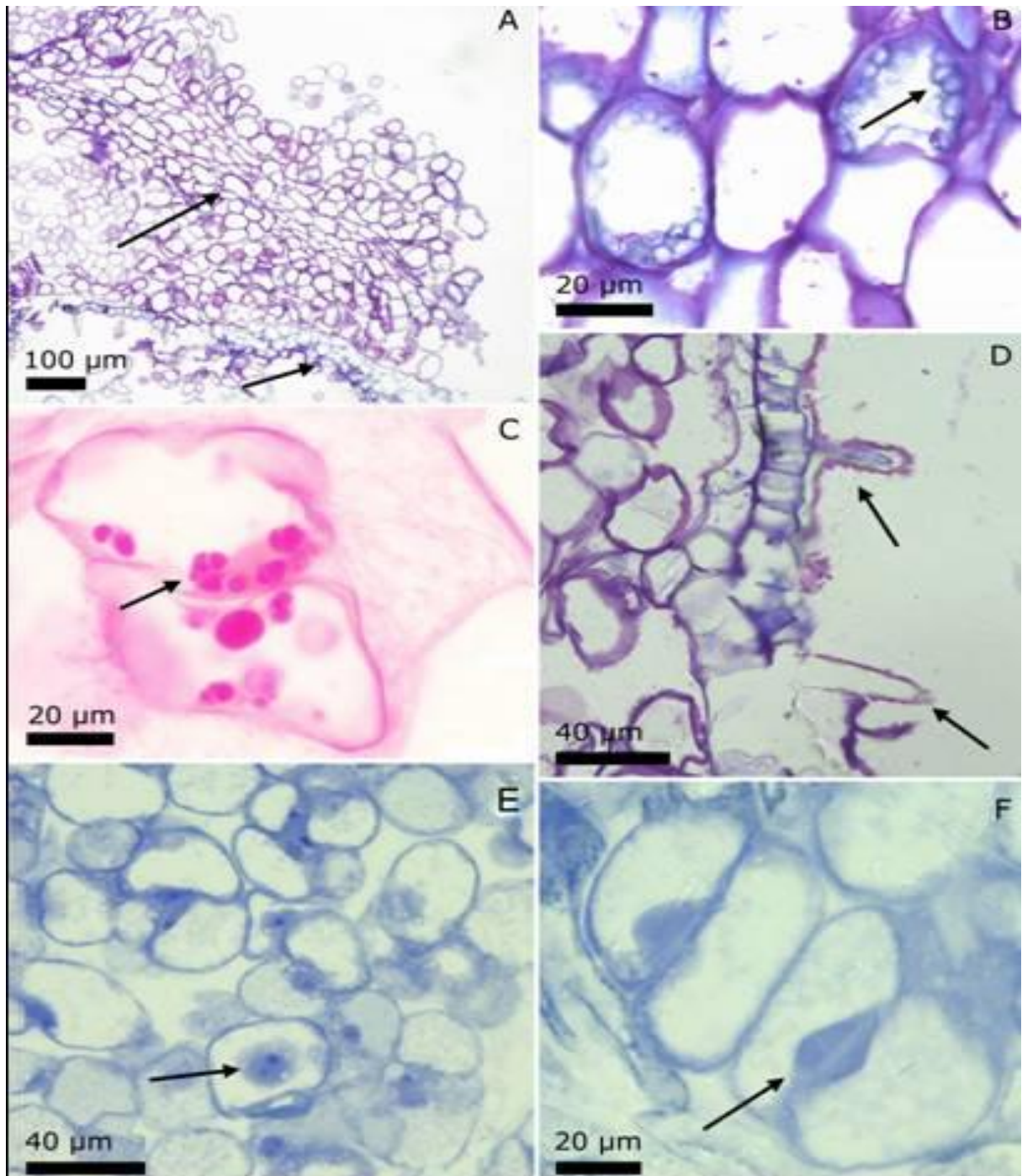


Figura 12. Caracterização citoquímica de calos maduros (40 dias) de *Tabebuia avellanedae* (8 meses). [A] Grupo de células coradas com ao AT-O com reação metacromática na parede celular. [B] Detalhe de um agregado celular corado com AT-O com conteúdo citoplasmático ortocromático (seta) [C] Células PAS positivas na parede celular e em grãos de amido no citoplasma (seta). [D] Porção de um agregado celular com região superficial com citoplasma ortocromático e células alongadas (setas). [E] Grupo de células coradas com CBB mostrando núcleos grande com um ou dois nucléolos (seta). [F] Células com região nuclear parietal CBB positiva [seta].

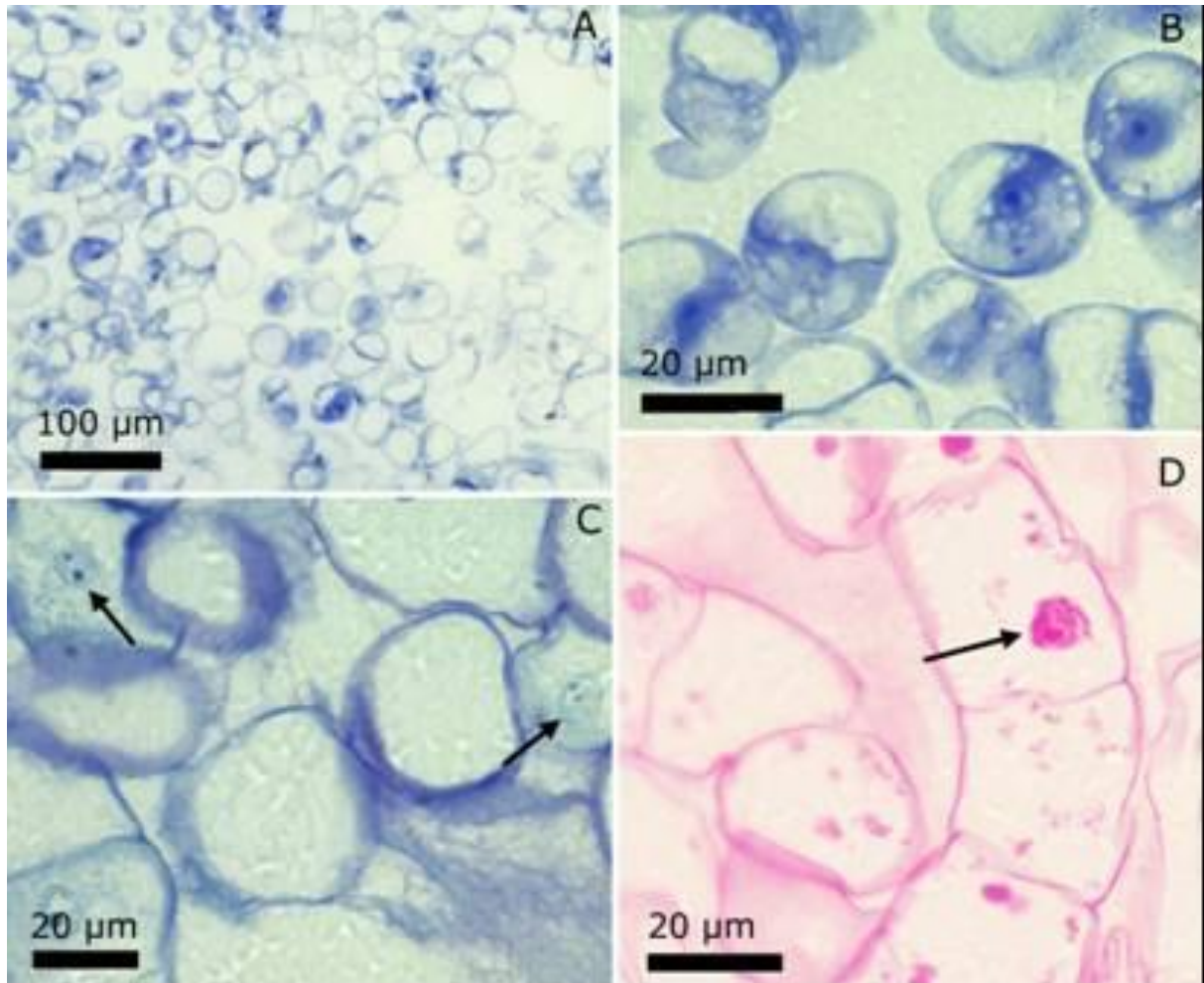


Figura 13. Caracterização citoquímica de calos maduros (40 dias) de *Tabebuia avellanedae* (4 meses). [A] Grupo de células coradas com ao CBB com reação positiva para o citoplasma periférico e região nuclear. [B] Detalhe de um agregado celular corado com CBB com conteúdo citoplasmático positivo ao corante. [C] Células corados com AT-O com reação metacromática pouco evidente. Observe os núcleos com dois nucléolos (setas) [D] Células periféricas com formato retangular com reação PAS positiva para a parede celular e para os grãos de amido [seta].

Confirmando as observações realizadas ao MO, foram destacadas nas Figuras 14, 15 e 16 as características ultraestruturais por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nestas as células de calos apresentavam os núcleos grandes com nucléolos elétrondenso, pequenas áreas elétron-transparentes onde a é cromatina difusa. Foram detectadas paredes celulares de células justapostas, local em que provavelmente podem ser estabelecidas conexões intercelulares. Estas células mostraram organização subcelular típica de células indiferenciadas com destaque para a presença de proplastídios (Figura 14 A). Nas células dos calos jovens porções de retículo endoplasmático rugoso estavam presentes em diferentes porções do citoplasma periférico (Figura 14 A e B). Estes elementos de RER foram observados próximos a proplastídios e também a mitocôndrias. Amiloplastos e corpos de

Golgi também foram observados nestas células (Figura 14 E e F). As paredes celulares apresentaram aspecto eletrondenso homogêneo, onde algumas em células adjacentes foi possível visualizar coalescência das paredes (Figura 14 C) ou células separadas constituindo um agregado frouxo (Figura 14 D).

Nas células dos calos maduros foi verificada a presença de pequenos vacúolos presentes no citoplasma que aparentemente liberam seus conteúdos ou se fundem a um vacúolo maior. (Figura 15 A e E). O núcleo é grande com conteúdo homogêneo e nucléolo evidente. Algumas vezes foram observadas mitocôndrias na região perinuclear (Figura 15 C). Várias células apresentaram citoplasma ocupando uma maior extensão do volume celular comparado ao observado nas células dos calos jovens. Nestas células os amiloplastos apresentaram diferentes tamanhos onde os maiores mostraram conteúdo subdividido (Figura 16 A, B e D). A presença de mitocôndrias ao redor do envelope nuclear, corpos de Golgi, riqueza em retículos endoplasmáticos rugosos, inúmeros ribossomos livres e grandes nucléolos (Figura 16 C, D e F). Os corpos de Golgi estão dispostos em torno do amiloplasto ou próximos das mitocôndrias sugerindo uma interação metabólica (Figura 16 C e D). Entre os numerosos fragmentos de RER também foram observados algumas mitocôndrias (Figura 16 F). Pequenos vacúolos foram observados no citoplasma periférico. (Figura 16 E). Estas características descritas acima indicam uma intensa atividade metabólica.

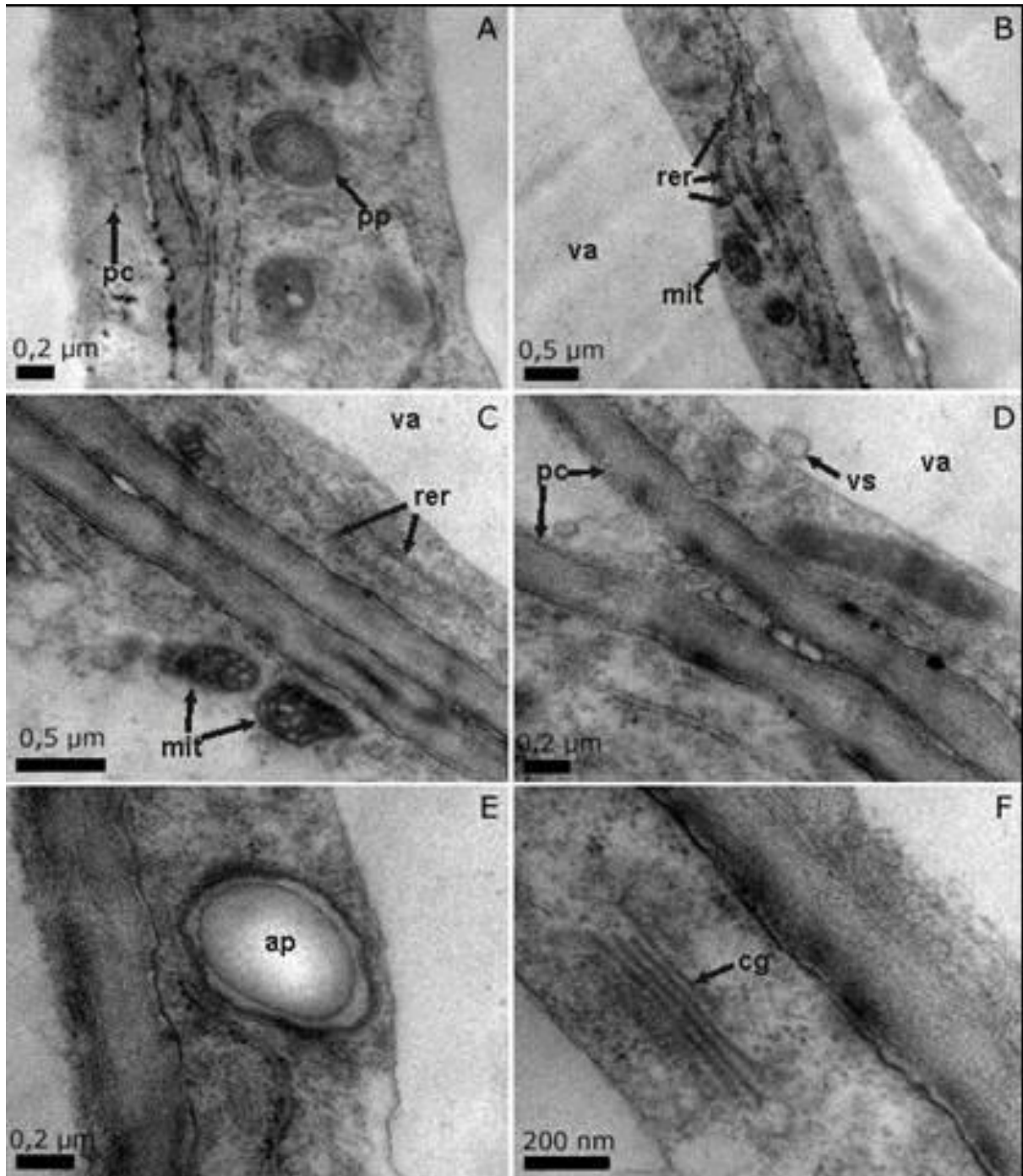


Figura 14. Aspectos ultraestruturais de calos jovens (20 dias) de *Tabebuia avellaneda* (8 meses). [A] Parede celular com cerca de $0,4 \mu\text{m}$, presença de pró plastídio em citoplasma estreito. [B-C] Grande vacúolo, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias no citoplasma. [D] Paredes celulares de células justapostas, vesícula sendo secretada do citoplasma para o vacúolo. [E] Pequeno amiloplasto presente. [F] Visualização de corpo de Golgi. (pc)-parede celular, (pp)-proplastídio, (va)-vacúolo, (rer)-retículo endoplasmático rugoso, (mit)-mitocôndria, (vs)-vesícula, (ap)-amiloplasto, (cg)-corpo de Golgi.

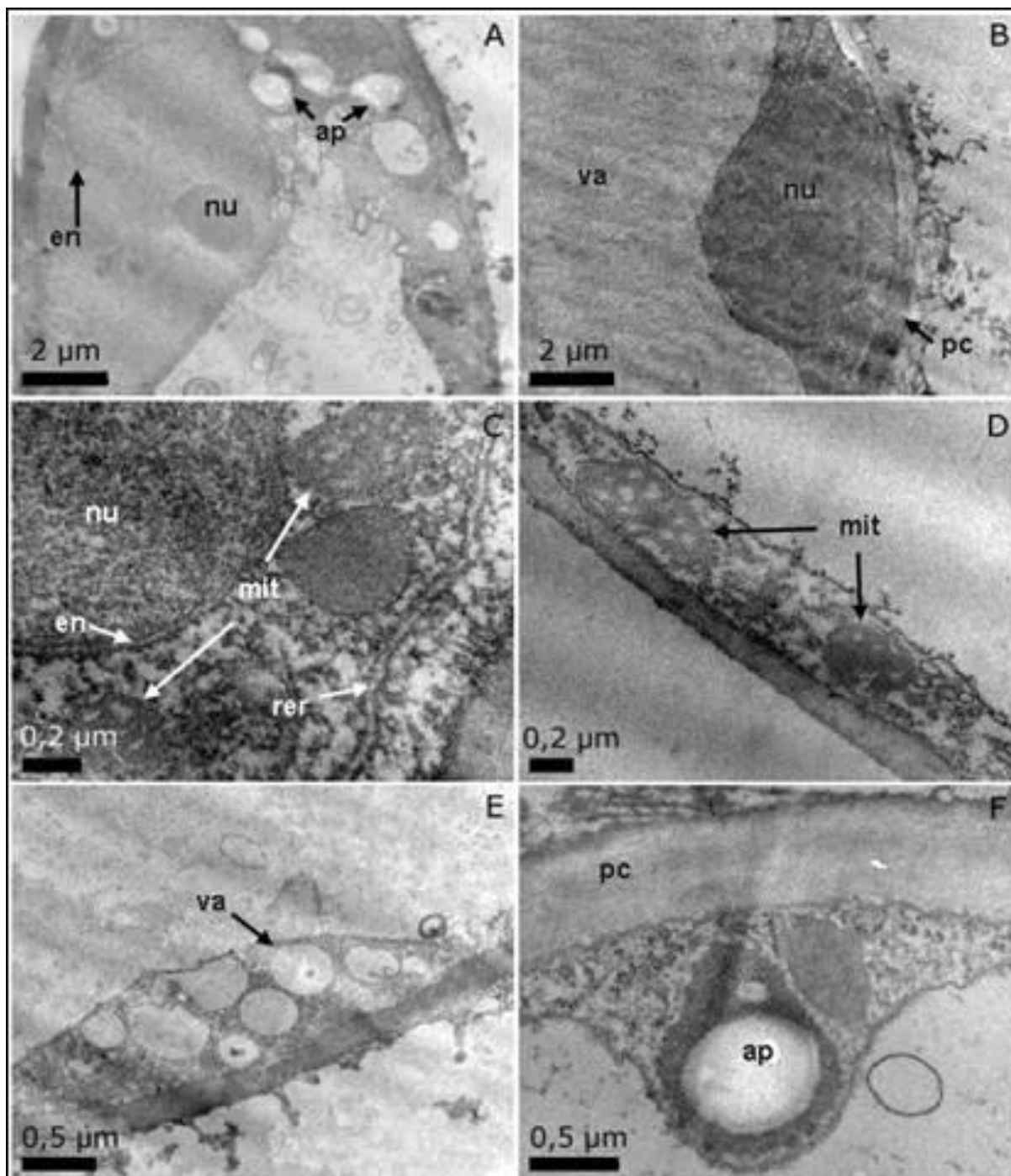


Figura 15. Aspectos ultraestruturais de células de calos maduros (40 dias) de *Tabebuia avellanedae* (8 meses). [A] Citoplasma periférico com presença de amiloplastos e núcleo ativo envolto por envelope nuclear. [B-C] Núcleo grande parietal por grande vacúolo, mitocôndrias perinucleares, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres. [D] Mitocôndrias observadas no delgado citoplasma. (E) Pequenos vacúolos presentes no citoplasma. [F] Citoplasma com amiloplastos e ribossomos livres. (nu)-núcleo, (en)-envelope nuclear, (ap)-amiloplastos, (va)-vacúolo, (pc)-parede celular, (rer)-reticulo endoplasmático rugoso, (mit)-mitocôndria.

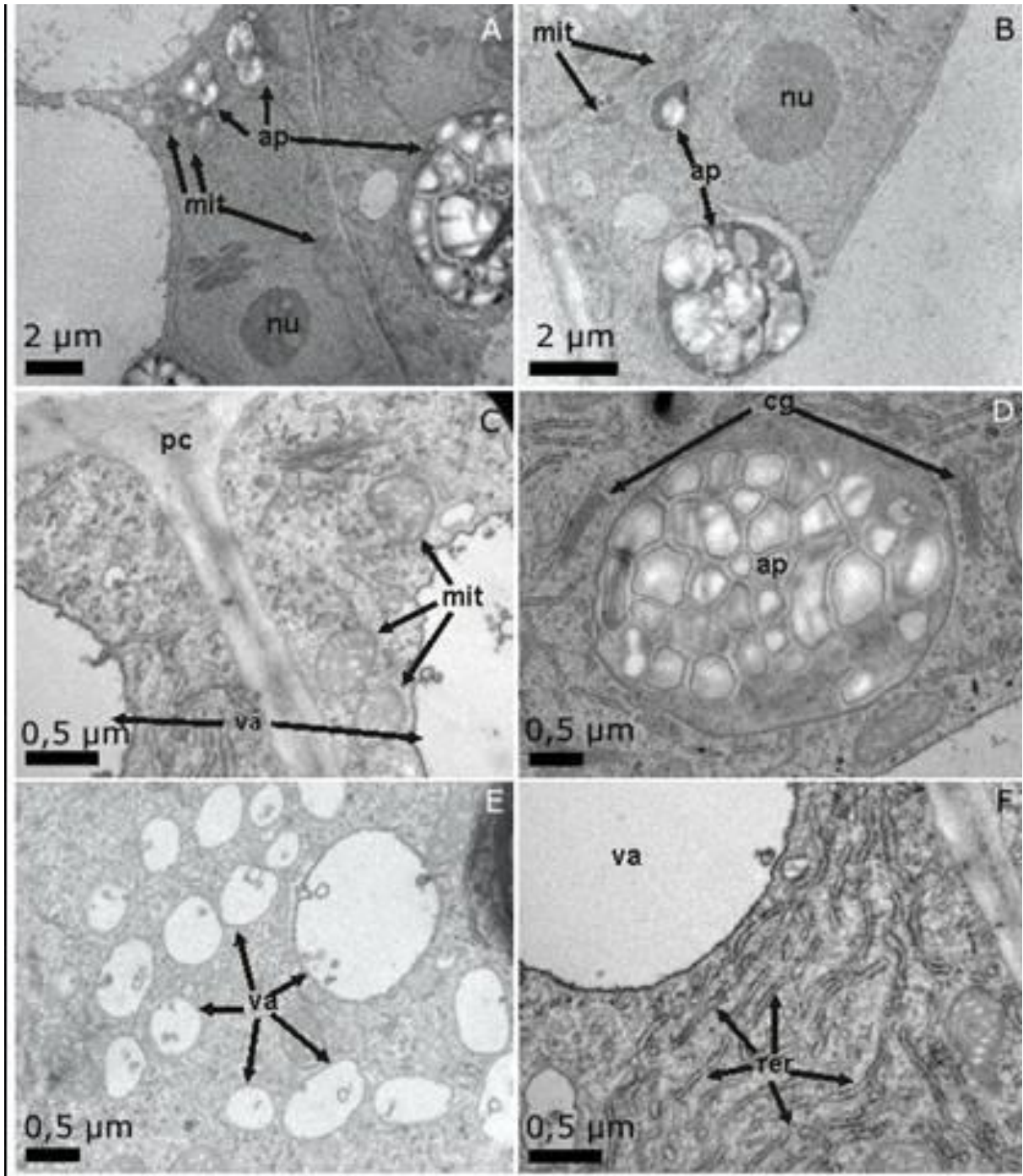


Figura 15. Aspectos ultraestruturais de calos maduros (40 dias) de *Tabebuia avellanedae* (4 meses). [A-B] Núcleo grande, presença de mitocôndrias ao redor do envelope nuclear e presença de amiloplastos subdivididos. [C] Parece celular de células justapostas, vacúolos grandes e mitocôndrias visíveis. [D] Subdivisão de amiloplasto em detalhe, e corpos de Golgi indicados por setas. [E] Pequenos vacúolos presentes no citoplasma. [F] Numerosos fragmentos de RER e ribossomos livres. (nu)-núcleo, (va)-vacúolo, (ap)-amiloplastos, (rer)-retículo endoplasmático rugoso, (mit)-mitocôndria, (pc)-parede celular, (cg)-corpo de golgi.

6 DISCUSSÃO

6.1 GERMINAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE *TABEBUIA ROSEOALBA* E *TABEBUIA PENTAPHYLLA*

De acordo com Lorenzi (2000) as sementes de várias espécies de *Tabebuia*, de *Cybistax antisiphilitica* e *Zeyheria tuberculosa*, todas pertencentes à família Bignoniaceae apresentam viabilidade em armazenamento inferior a 4 meses e quando não menciona o período da viabilidade em armazenamento recomenda que sejam colocadas para germinar logo após a coleta, o que indica a fragilidade das espécies com relação à conservação. Há referências que indicam que as sementes de *T. roseoalba* apresentam queda na viabilidade quando armazenadas em temperatura ambiente (25°C), mas não existem trabalhos detalhados indicando dinâmica em que essa queda ocorre. O mesmo ocorre com as informações disponíveis na literatura sobre a dinâmica da perda da viabilidade quando as sementes são armazenadas em geladeira (5°C). Da mesma maneira não existem trabalhos que descrevam as modificações estruturais, bioquímicas e moleculares envolvidas no processo de perda da viabilidade das sementes dessa espécie. Para a realização, no futuro, de tais estudos torna-se imprescindível monitorar com precisão a perda da viabilidade das sementes em função do tempo de armazenamento e nesse sentido os resultados obtidos no presente trabalho são relevantes. O fato da viabilidade das sementes de *T. roseoalba* decrescer 14,4% na quarta semana de armazenamento em temperatura ambiente em relação ao armazenamento em geladeira é indicativo de que as alterações fisiológicas relacionadas com a deterioração das sementes já estariam ocorrendo. No caso de *T. pentaphylla* o armazenamento das sementes de uma a quatro semanas em temperatura ambiente não reduziu a viabilidade em relação ao armazenamento em geladeira, a redução da viabilidade em temperatura ambiente foi detectada apenas a partir de 40 dias de armazenamento, com quedas de 15,2%, 20,8% (após 75 dias de armazenamento), 48% (após 90 dias de armazenamento) e 81,6% (após 6 meses de armazenamento) em relação ao controle.

Os resultados obtidos por Degan *et al.* (2001) para sementes de *Tabebuia roseoalba* foram semelhantes ao encontrados, observando que o ambiente de câmara fria foi eficiente para conservar as sementes, porém quando armazenadas em ambiente normal de laboratório não houve eficiência na conservação com um mês de armazenamento. Estes

resultados já haviam sido descritos por Kageyama e Marquez (1981), quando compararam os resultados de armazenamento em temperatura ambiente com câmara fria (geladeira). Estes autores também verificaram a existência de uma maior velocidade na perda de viabilidade na temperatura ambiente e confirmaram que além do teor de umidade inicial, a temperatura interage, afetando consideravelmente o período de conservação da espécie. Mas os resultados observados no presente trabalho demonstram que mesmo em temperatura de (5°C), comuns em geladeiras e câmaras frias, que são as condições popularmente utilizadas para o armazenamento de sementes com baixo teor de água, as sementes de *T. roseoalba* apresentaram queda de viabilidade: a deterioração das sementes em geladeira se acentuou ainda mais após 6 meses, 19 meses e 25 meses de armazenamento, quando perderam de 23% a 30% do poder germinativo em relação à taxa de germinação que apresentavam no momento da coleta (90%). Não apenas houve redução da viabilidade como também queda nos índices de velocidade de germinação, reflexo das alterações fisiológicas, e redução no teor de água das sementes de 8,3% para 6,6%, após 10 meses de armazenamento em geladeira. Ao contrário, as sementes de *T. pentaphylla* não sofreram queda na viabilidade em geladeira mesmo após 15 meses de armazenamento, mas a redução do teor de água de 7,1% para 4,8% após 15 meses não alterou a viabilidade das sementes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Moratelli (2003) para *T. avellanae* em que o poder germinativo das sementes caiu de 76%, no momento da coleta, para 37,6%, após 17 semanas de armazenamento em geladeira, e para 33,6%, após 24 semanas de armazenamento. Simões (2009) constatou que sementes de *T. impetiginosa* mantiveram a viabilidade quando armazenadas em geladeira por 8 meses de armazenamento, mas perderam totalmente a viabilidade em temperatura ambiente, quando armazenadas pelo mesmo período, enquanto que a viabilidade de sementes de *Cybistax antisiphilitica* decresceu apenas 22,4% em temperatura ambiente, após 7 meses de armazenamento. Maeda e Mathes (1984) investigaram a viabilidade das sementes de *Tabebuia chrysotricha*, *T. avellanae*, *T. impetiginosa*, *T. rosea* e *T. heptaphylla*, encontrando diferentes índices de germinação e viabilidade nesse gênero. Os resultados obtidos no presente trabalho e os disponíveis na literatura indicam diferenças entre as espécies de Bignoniaceae com relação à sensibilidade das sementes às condições de armazenamento convencionais e apontam para a necessidade de serem conduzidos estudos, que elucidem o mecanismo envolvido na perda da viabilidade das sementes e que permitam delinear estratégias para prolongar a viabilidade e otimizar o armazenamento.

As sementes das espécies *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia pentaphylla* apresentaram taxa de teor de umidade inicial de 8,4% e 7,1%, respectivamente. Wetzel (2003), estudando espécies florestais, encontrou resultados semelhantes para a espécie *Tabebuia umbellata* (Sond.) Sandw (8,9%) e Souza (2005) para *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich (8,0%). Na proposta de Wielewicki *et al.* 2006, os seguintes valores foram encontrados para três espécies de mesmo gênero: *Tabebuia alba* (Cham.) Sandwith (8,3%), *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex A. DC.) Standl. (9,0%) e *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (9,2%). Os resultados destes autores são similares aos obtidos no presente estudo, e quanto à classificação para sementes das espécies consideradas como ortodoxas. As sementes ortodoxas se mantêm viáveis após a dessecação até um grau de umidade em torno 5% e podem ser armazenadas sob baixas temperaturas por um longo período (CARVALHO *et al.*, 2006).

Na maioria das sementes ortodoxas os teores de água ótimos para armazenamento a -20°C estão entre 4% e 7% (STANWOOD e BASS, 1978, *apud* REED *et al.*, 2001). Este tipo de armazenamento é muito comum em bancos de sementes, mas Gonzalez-Benito *et al.* (2009) alertam para as mudanças fisiológicas e até mesmo para os danos genéticos que podem ocorrer em sementes armazenadas por longos períodos nessas condições. Essas deteriorações devem ser consideradas quando as espécies estão ameaçadas devido à escassez de populações, à baixa produção de sementes ou à degradação dos ambientes onde ocorrem. Portanto, o desenvolvimento de protocolos de criopreservação é importante. A criopreservação permite o armazenamento das sementes ortodoxas por longos períodos, as sementes de espécies tolerantes à dessecação e tolerantes ao nitrogênio líquido apresentam altas taxas de sobrevivência quando o teor de umidade está entre 5% e 10% e Stanwood (1985) afirma que o armazenamento criogênico de várias espécies com sementes ortodoxas tem sido conduzido com sucesso. Desta forma, Stanwood (1985) determina um teor de água ideal para que as sementes possam ser submetidas ao armazenamento em nitrogênio líquido. Estabelecendo-se um limite máximo no teor de umidade da semente, o método de criopreservação pode ser otimizado. Entretanto, vários autores tem indicado, para algumas espécies com sementes ortodoxas, problemas após a criopreservação tais como queda dos cotilédones (STANWOOD, 1985; e PRITCHARD *et al.*, 1988, *apud* PITA *et al.*, 1998), germinação anormal (STANWOOD, 1980, *apud* Pita *et al.*, 1998) ou morte da semente por danos internos causados pelo congelamento, indicando, segundo Pita *et al.* (1998), que avaliações devem ser conduzidas, após a criopreservação, antes de se propor esse método para a conservação de sementes. Por essa razão foram conduzidos, no presente trabalho, as avaliações do

crescimento das plantas obtidas a partir das sementes criopreservadas e os resultados obtidos para *T. roseoalba* e *T. pentaphylla* permitiram concluir a eficácia da criopreservação, pela produção de plantas normais a partir das sementes criopreservadas. O fato das sementes de *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia pentaphylla* terem mostrado tolerância ao nitrogênio líquido se deve ao fato de apresentarem teores de água dentro da faixa estabelecida por Stanwood (1985). Resultados semelhantes foram obtidos por Wetzel (2003), que observou que sementes da espécie *Tabebuia umbellata* apresentaram um aumento de germinação após criopreservação, sugerindo que podem ser conservadas nestas condições.

Vários fatores são determinantes para o sucesso dos processos de criopreservação, armazenamento e descongelamento de sementes. Bewley e Black (1984), estudando o armazenamento de sementes provaram que fatores como qualidade fisiológica inicial da semente, o teor de umidade, a temperatura do armazenamento, condições de secagem, beneficiamento inapropriado, umidade relativa do ar, colheita imprópria, entre outros, influenciam o comportamento das sementes durante o armazenamento e estão diretamente relacionados com o tempo de vida de uma semente ortodoxa. Durante a realização do presente trabalho foram utilizadas sementes fornecidas pelo Instituto Florestal de São Paulo. Conforme Yamamoto *et al.* (2007), a certificação de sementes garante que essas foram coletadas respeitando-se as normas de coleta, portanto tais sementes possuem variabilidade genética, índice de germinação e procedência conhecidas.

A classificação das sementes quanto ao tipo mais adequado de armazenamento depende de estudos de tolerância à dessecação e a baixas temperaturas (HONG e ELLIS, 1996). Taiz e Zieger (2004) explicam que sementes e outros tecidos parcialmente desidratados podem ser mantidos indefinidamente em temperaturas abaixo de zero (-273°C) sem perda de viabilidade, porém deve ser observado que a limitação da formação de gelo contribui para a tolerância ao congelamento. O teor de água das sementes criopreservadas influencia a viabilidade das mesmas, dependendo do tipo de descongelamento, após a retirada do nitrogênio líquido. Nos experimentos conduzidos neste trabalho com *T. roseoalba* e *T. pentaphylla* utilizou-se o método de descongelamento lento, que consiste em submeter às sementes à temperatura ambiente de 25°C, por uma hora, após a retirada do nitrogênio líquido. Este procedimento foi adotado pois os resultados obtidos por Moratelli (2003), que testou diferentes métodos de descongelamento de sementes de *Tabebuia avellanadae* imersas em nitrogênio líquido por uma hora, o descongelamento rápido (em banho-maria a 45°C por três minutos) ou descongelamento lento (em temperatura ambiente a 25°C), indicaram não

haver diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos. Deve ser ressaltado o aspecto prático do descongelamento lento em relação ao rápido.

Nos trabalhos conduzidos por Salomão (2002), Wetzel *et al.* (2003) e Lima *et al.* (2008) com espécies do gênero *Tabebuia*, os períodos de armazenamento em nitrogênio líquido foram por períodos curtos, respectivamente de 3 dias, 7 dias e 3 dias. As vantagens dos experimentos conduzidos no presente trabalho é que tanto para *T. roseoalba* como para *T. pentaphylla* foram avaliados tempos longos de armazenamento em nitrogênio líquido. Experimentos sobre ao armazenamento criogênico de sementes por longos períodos seguidos da avaliação do crescimento das plantas obtidas são menos comuns na literatura. Apesar de terem sido realizados experimentos por períodos de dez e quinze meses de armazenamento em nitrogênio líquido deve-se ressaltar a importância da realização de estudos por períodos ainda mais longos. Um dos resultados relevantes obtidos neste trabalho para *T. roseoalba* e para *T. pentaphylla*, além de não terem sido verificadas diferenças entre as porcentagens de germinação de sementes mantidas em geladeira, por diferentes períodos, e as criopreservadas, foram as análises de crescimento das plantas produzidas a partir destas sementes, que indicaram que os tratamentos de armazenamento das sementes não reduziram o crescimento das plantas em termos da altura, massa seca da parte aérea e massa fresca total.

A análise de crescimento das plantas, para monitorar o efeito do armazenamento das sementes por longos períodos sobre o vigor das plantas obtidas, é extremamente necessária, pois Allen (1990, *apud* Pita *et al.*, 1998) observaram que sementes ortodoxas de *Pinus ponderosa* armazenadas 0°C, por 7 anos não perderam a viabilidade. O mesmo resultado foi obtido para *P. ellioti*, *P. patula*, *P. radiata* e *P. taeda*, após 6 anos de armazenamento a -16°C. Contudo, conforme observado por Barnett (1969, *apud* Pita *et al.*, 1998), períodos mais longos de armazenamento afetaram a viabilidade das sementes e o vigor das plantas, pois foi observado um decréscimo de 32% na germinação de *P. echinata*, após 10 anos de armazenamento a 1,1°C e 6% de umidade. Donald e Jacobs (1990, *apud* Pita *et al.*, 1998) observaram que em períodos de mais de 15 anos de armazenamento de sementes em *P. ellioti*, *P. patula*, *P. radiata* e *P. taeda* resultaram em um aumento de germinação anormal. Após 50 anos, a taxa de germinação caiu para 25% em *P. echinata* e 66% em *P. ellioti*, com notável perda do vigor das plantas, o que poderia estar correlacionado com a ocorrência de aberrações cromossômicas durante o período de armazenamento.

Com relação à eficácia da temperatura de 0°C (congelador), para a conservação das sementes, vale a pena ressaltar que no presente trabalho essa temperatura foi tão letal quanto a temperatura ambiente, tanto para as sementes de *T. roseoalba* como para sementes

de *T. pentaphylla*, sendo que para *T. pentaphylla* foi possível monitorar a perda da viabilidade e concluir que, entre 3 e 6 meses de armazenamento nessa condição, a viabilidade foi diminuída de 59% e que, a partir de 13 meses, todas as sementes estavam inviáveis, assim para *T. pentaphylla* é possível afirmar que a condição de 0°C é eficiente para conservação das sementes por 3 meses. A sensibilidade das sementes à temperatura de 0°C também ocorreu para *T. avellanae* (SOUZA, 2007) em que a viabilidade foi reduzida em 52,8%, após 19 meses de armazenamento nessa temperatura; já para *Cybistax antysiphilitica* as sementes não perderam a viabilidade, quando armazenadas a 0°C por 7 meses e nem as sementes de *T. impetiginosa* quando armazenadas a 0°C por 8 meses (SIMÕES, 2009). Estudos adicionais devem ser conduzidos com essas e outras espécies de *Tabebuia*, para determinar com precisão a partir de que período a viabilidade das sementes armazenadas a 0°C começa a declinar e quais as alterações bioquímicas e moleculares envolvidas no mecanismo da perda da viabilidade nessa temperatura.

As sementes de *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia pentaphylla* utilizadas no presente estudo, armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) por um período de dez e quinze meses, respectivamente, apresentaram valores semelhantes nos índices de germinação em relação às sementes armazenadas em geladeira (5 °C) e freezer (-20 °C). Tais resultados corroboram com os obtidos por Martins L. *et al.* (2009), no trabalho com sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl), em que constatou que sementes desta espécie foram previamente desidratadas à 4,2% de teor de água e posteriormente imersas em nitrogênio líquido, por pelo menos 360 dias, sem redução na qualidade fisiológica. Resultados semelhantes foram observados por Mello e Eira (1995), trabalhando com sementes de *Tabebuia* spp. acondicionadas em embalagem impermeável, que mantiveram seu poder germinativo durante dois anos, armazenadas em freezer a -20°C. Cunha *et al.* (1992, apud Oliveira, 2005) trabalharam com três espécies do mesmo gênero e verificaram que o armazenamento a longo prazo dessas sementes também pode ser efetuado em banco de germoplasma a -20 °C, desde que sua umidade seja inferior a 10%. A vantagem dos protocolos de criopreservação desenvolvidos nesse trabalho com as espécies *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia pentaphylla*, que apresentam índices naturalmente baixos de teor de água, é que não foi necessária a dessecação prévia das sementes, o que torna os protocolos práticos. Entretanto, na literatura são descritos vários casos em que são necessários procedimentos de dessecação das sementes para garantir o sucesso da criopreservação, como em sementes de *Passiflora* spp. por González-Benito *et al.* (2009), de *Citrus* spp. por Hamilton *et al.* (2009), e de *Pistacia* spp. por Ozden-Tokatli *et al.* (2006). A criopreservação

é considerada como a preservação de material biológico em temperaturas ultra-baixas, com a utilização de nitrogênio líquido a -196°C , ou, em sua fase de vapor a -150°C . Nas temperaturas ultra-baixas do nitrogênio líquido, ocorre significativa redução do metabolismo celular, resultando na virtual paralisação da deterioração biológica (SANTOS, 2001). Portanto, a temperatura do nitrogênio líquido favorece a conservação de sementes por longos períodos de tempo, mantendo sua viabilidade durante o armazenamento e a estabilidade genética (BENSON, 1999).

Os resultados de perda da viabilidade observados neste estudo, para sementes de *Tabebuia pentaphylla* armazenadas em temperatura ambiente, por 15 meses, estão de acordo com Silva *et al.* (2001), que sugeriram que a respiração deve acelerar o processo de deterioração em temperatura ambiente. Os autores sugerem ainda a eficiência da liofilização para a conservação de sementes que podem então ser armazenadas por até 16 meses em temperatura ambiente, mantendo a porcentagem média de germinação de 60%. Observaram que a liofilização foi desnecessária, quando as sementes foram armazenadas em câmara fria (geladeira). Ressaltam ainda que sementes não liofilizadas, armazenadas em geladeira, se conservaram melhor em comparação com as liofilizadas armazenadas em temperatura ambiente. Os dados obtidos neste trabalho são semelhantes aos encontrados na pesquisa conduzida pelos autores acima mencionados, pois demonstram a eficiência da conservação de sementes das sementes de *T. pentaphylla* em geladeira por até 15 meses. Durante o andamento desta pesquisa, mesmo não tendo sido detectadas quedas significativas sobre a viabilidade das sementes mantidas em geladeira, é possível que vantagens no armazenamento em nitrogênio líquido possam aparecer em períodos de armazenamento superiores aos quinze meses testados.

Os experimentos realizados no presente trabalho para testar o efeito da segunda criopreservação sobre a viabilidade das sementes tiveram por objetivo verificar por quanto tempo, após a primeira criopreservação, poderiam ficar em temperatura ambiente ou em geladeira sem perder a viabilidade e se poderiam ser criopreservadas novamente, com sucesso. Os resultados desses experimentos têm aplicação prática, facilitando o intercâmbio de germoplasma, pois quando se considera um banco de sementes no qual, usualmente, as sementes estariam sendo conservadas em nitrogênio líquido, estas poderiam ser remetidas pelo correio para outros locais, em temperatura ambiente, sem a necessidade de criopreservação durante o transporte, o que tornaria o processo mais oneroso.

Para as sementes de *Tabebuia roseoalba*, constatou-se que, depois do processo de criopreservação, podem ser submetidas à temperatura ambiente ou geladeira por apenas uma

semana, sem que a viabilidade seja prejudicada, enquanto que para *T. pentaphylla* as sementes podem permanecer por até 3 semanas em temperatura ambiente ou geladeira, sem que a viabilidade seja reduzida após à segunda criopreservação. Dessa forma, na situação hipotética das sementes estarem armazenadas em nitrogênio líquido em um banco de germoplasma e precisarem ser transportadas para outro local, não é necessário que o transporte seja feito em nitrogênio líquido ou ambiente refrigerado, respeitados os devidos períodos mencionados acima. E ainda assim, quando chegarem ao destino podem ser criopreservadas novamente, sem que a viabilidade seja alterada.

6.2 CULTURA IN VITRO DE *TABEBUIA ROSEOALBA* E *TABEBUIA AVELLANEDAE*

O protocolo de assepsia das sementes utilizado no presente estudo foi o desenvolvido por Higa (2006) em estudos com *Tabebuia heptaphylla*. Este protocolo foi eficiente para a obtenção de plântulas axênicas das espécies *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia avellanadae*, confirmando os resultados obtidos pela autora acima e permitindo uma alta porcentagem de germinação das sementes, passo preliminar importantíssimo para o estabelecimento de sistemas de cultura *in vitro*. O hipoclorito de sódio vem sendo utilizado com sucesso na desinfecção de muitas espécies lenhosas que apresentam sérios problemas de contaminação por microorganismos (RIBAS *et al.*, 2005). Nos estudos de Botelho *et al.* (2008) com as espécies *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia impetiginosa* foram observados que protocolos de assepsia com hipoclorito de sódio reduziram, de forma significativa, a incidência de contaminação por fungos, praticamente em todas as amostras avaliadas. Nunes (2000) relata que quando se trabalha com lotes de sementes de uma mesma espécie, mas de procedências diferentes, o processo de desinfecção talvez tenha que ser ajustado para garantir maior eficiência. Isto porque fatores como: o ambiente, o período e as formas de coleta, assim como o beneficiamento e o armazenamento das sementes podem ser determinantes quanto ao tipo de protocolo de desinfecção a ser utilizado. Para o sucesso da cultura *in vitro* de espécies lenhosas, deve ser estabelecida uma forma eficiente de desinfecção das sementes que não prejudique a germinação e simultaneamente permita a obtenção de plântulas axênicas, fontes dos explantes a serem utilizados para iniciar as culturas.

Em todos os experimentos de cultura *in vitro* realizados neste estudo, foi utilizado como meio de cultura padrão o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), que assegurou

respostas satisfatórias de germinação, estabelecimento, crescimento e manutenção de plântulas ou explantes das espécies *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia avellanadae*. George *et al.* (2008) afirmaram que para dar início à propagação de plantas por métodos de cultura de tecidos, é necessário ter uma compreensão clara da maneira que o material vegetal pode ser cultivado e manipulado em tubos de ensaio. Tecidos e órgãos de plantas crescem *in vitro* em um meio artificial, que suplementa os nutrientes necessários para o desenvolvimento. O sucesso da cultura de tecidos de plantas como um meio de propagação é fortemente influenciado pela natureza do meio de cultura, e o meio comumente utilizado é a formulação de Murashige e Skoog (1962). Os testes relatados por Nery *et al.* (2008) e Higa (2006) com os meios de cultura MS e WPM, apresentaram resultados semelhantes na germinação *in vitro* de *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia heptaphylla*, sendo ambos recomendados. Dousseau *et al.* (2008) e Abbade *et al.* (2009) também relataram a utilização do meio MS para o cultivo *in vitro* de plantas das espécies *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia roseoalba*, respectivamente, para analisar a anatomia foliar de plântulas estabelecidas *in vitro* e *in vivo*, e constataram diferenças quanto aos aspectos anatômicos relacionados à eficiência fotossintética e à capacidade de regulação hídrica das plantas. Todavia neste estudo não foram verificadas diferenças significativas entre os valores de germinação *in vitro* e *ex vitro*, resultado semelhante ao encontrado por Higa (2006) para *Tabebuia heptaphylla*. Quando Nery *et al.* (2008) compararam a germinação *in vitro* e *ex vitro* da espécie *Tabebuia serratifolia*, evidenciaram que a germinação *in vitro* propiciou maiores taxas de germinação em relação à germinação *ex vitro*. Após a germinação *in vitro* houve o estabelecimento de plântulas axênicas das espécies *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia avellanadae*, sendo que aos 50-52 dias após a inoculação das sementes as plântulas de *T. roseoalba* produziram 1,83 nós foliares/plântula enquanto que as plântulas de *T. avellanadae* 2,73 nós foliares/plântula, apresentando, portanto, porte adequado para o fornecimento de diferentes explantes para os experimentos com os reguladores de crescimento exógenos.

Nos experimentos sobre cultura *in vitro* realizados neste trabalho foram analisados, isoladamente, os efeitos, tanto de citocininas sobre a iniciação de culturas de ramos, bem como de auxinas sobre a indução de calos. De acordo com Taiz e Zeiger (2004), o uso auxinas e citocininas é justificado por induzir respostas específicas nos explantes. Estes fitorreguladores são substâncias reguladoras do ciclo celular, necessários à divisão celular. Além da divisão celular, a razão entre auxina e citocinina determina a diferenciação em raiz ou gema de tecidos vegetais cultivados *in vitro* (TAIZ e ZEIGER, 2004). O uso de reguladores de crescimento em culturas *in vitro* tem como principal objetivo suprir as

possíveis deficiências dos níveis endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados nas regiões produtoras na planta matriz (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). De acordo com Davies (1995), os fitorreguladores são moléculas orgânicas que atuam, em baixas concentrações, no desenvolvimento vegetal.

Sistemas eficientes de cultura de ramos a partir do cultivo de nós apicais, foliares e cotiledonares foram induzidos para *T. avellanae*, na presença de 2,5 µM de BAP, sendo que o explante mais eficiente para o estabelecimento de tais sistemas foi o nó cotiledonar. Como as gemas são propágulos vegetativos que potencialmente podem originar novas plantas, pelo número médio de gemas produzidas por planta é possível extrapolar a taxa de multiplicação das culturas, que no caso dos nós cotiledonares seria de 7,7 (3,3 ramos/explante), após ciclos de cultura de 8 semanas. Para nós foliares a taxa de multiplicação seria de 7,5 (2,4 ramos/explante), no primeiro experimento, na ausência de BAP e de 5,8, no segundo experimento, e para nó apical seria de 5,3 (2,6 ramos/explante). A utilização de cinetina não parece ter alterado as taxas de multiplicação de modo significativo sendo de no máximo 5, para nó foliar e de no máximo 6,4, para nó foliar. González-Rodríguez *et al.* (2010) obtiveram resultados semelhantes para *Tabebuia donnell-smithii rose* em que 3,6 ramos/explante foram produzidos a partir de nós coletados de plantas maduras cultivados com 30 µM de zeatina. Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que tanto o BAP como cinetina são eficientes para estabelecer cultura de ramos de *T. avellanae*.

É importante ressaltar a relevância desses dados, pois, através da micropropagação, poderiam ser produzidas plantas em escala comercial, constantemente, para o suprimento de mudas uma vez que a disponibilidade de sementes dessa espécie no mercado, durante o ano, é deficitária, muitas vezes as sementes não estão disponíveis e em outras vezes estão, mas o poder germinativo é baixo. Experimentos preliminares conduzidos com ácido indol butírico (AIB), em diferentes concentrações, não resultaram no enraizamento das plantas, o que indica que esta fase da micropropagação deve ser melhor estudada em experimentos futuros, para desenvolver protocolos de enraizamento e aclimatização das plantas micropropagadas. Outro aspecto a ressaltar é que o sistema de produção de ramos desenvolvido para *T. avellanae* é o passo inicial para o desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro* de germoplasma, tanto através das técnicas de restrição do crescimento como das técnicas de criopreservação de propágulos vegetativos, podendo tais protocolos serem aplicados para a conservação de germoplasma de outras espécies da família Bignoniaceae.

Resultados semelhantes aos obtidos com as espécies *Tabebuia roseoalba* e *Tabebuia avellanedae* foram encontrados por Martins J. *et al.* (2009) em relação à indução de brotações a partir da cultura de nós apicais, foliares e cotiledonares de *Tabebuia impetiginosa*, sem a suplementação de citocinina exógena. Camillo (2008) também descreveu que o número de brotações regeneradas por explantes mantidos em meio de cultura MS na ausência de reguladores de crescimento foram considerados satisfatórios para atender a demanda de explantes destinados à conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium*. Silva *et al.* (2003) também relataram que os melhores resultados para proliferação de brotos foram observados, para espécie *Catharanthus roseus*, na ausência de fitoreguladores e no menor nível de cinetina, e os piores com a combinação dos níveis de cinetina na presença de 2,4-D. No presente trabalho os piores resultados apresentados para proliferação de ramos ou gemas, com a espécie *Tabebuia avellanedae*, ocorreram com a utilização do 2,4-D, porém, testado de forma isolada e não em combinação com citocininas.

Os protocolos de indução de calos desenvolvidos para *T. roseoalba* permitiram alta frequência de indução a partir de cotilédones e hipocótilo somente quando utilizado o 2,4-D. O mesmo resultado foi observado para *T. avellanedae* em que, na presença de 2,4-D, foram induzidos calos em segmentos de cotilédones, de folhas, de hipocótilo, em nós foliares e cotiledonares. Na ausência de 2,4-D apenas uma pequena proporção dos explantes de *T. roseoalba* formaram calos e no caso de *T. avellanedae* apenas segmentos de hipocótilos. Níveis endógenos ótimos para o crescimento dos calos foram alcançados, para explantes de *T. avellanedae* na concentração de 1,25 μM de 2,4-D, enquanto para *T. roseoalba* nas concentrações de 1,25 e 2,5 μM de 2,4-D, indicando diferença entre as espécies. Outro aspecto observado com relação à influência da espécie na produção de calos é quando se considera os mesmos tipos de explantes e mesmas concentrações de reguladores de crescimento, em que os calos de *T. roseoalba* foram muito menores em massa seca do que os de *T. avellanedae*.

A possibilidade de se desenvolver calos a partir de diferentes explantes das plântulas, nas mesmas concentrações de um determinado regulador é relevante para futuros estudos comparativos sobre metabólitos secundários, pois calos originados a partir diferentes explantes podem ter diferentes potenciais para a produção, além de poderem ser induzidos à diferenciação através da organogênese. São vários os exemplos na literatura que confirmam a importância potencial destes resultados: a biossíntese de picrosídeo produzido por *Picrorhiza kurroa* (planta utilizada na medicina Ayurvedica para tratar doenças do fígado e vias do trato respiratório) é regulada pelo estágio de desenvolvimento, ramos derivados de culturas de

calos de raízes apresentaram nível menor que o comparado com ramos derivados de cultura de calos de segmentos de caule e de folhas (SOOD e CHAUHAN, 2010), naturalmente os constituintes ativos são obtidos de ramos, raízes e rizomas das plantas.

A produção de naftoquinonas em *Impatiens balsamina* pelas folhas é maior que pelas raízes, explantes de folhas produziram culturas de raízes com maior nível de naftoquinonas do que culturas de raízes originadas a partir de explantes de raízes (SAKUNPHUEAK e PANICHAYUPAKARANANT, 2010) e os autores afirmam que a iniciação das culturas *in vitro* a partir de material vegetal que já possua um alto potencial para a produção de metabólitos secundários pode prover um sistema com maior produção. Em *Psoralea drupaceae* a produção de bakuchiol (potente meroterpeno antimicrobiano) por sistemas *in vitro* foi investigada em partes aéreas de plântulas produzidas *in vitro*, em calos de diferentes origens (cotilédones, folhas, internós e raízes), em suspensões celulares derivadas de calos de cotilédones e em cultura de raízes em cabeleira indicando que a parte aérea das plântulas crescidas *in vitro* acumulou maiores quantidades da substância do que os demais sistemas (LYSTVAN *et al.*, 2010). A produção de alina em vários tecidos e órgãos de *Allium sativum* foi influenciada pelo tipo e idade do tecido, o máximo teor de alina foi observado em folhas de plântulas crescidas *in vitro*, em calos originados da cultura dos dentes de alho e em embriões somáticos no estágio de germinação (NASIM *et al.* 2010).

O fato de nós cotiledonares de *T. avellanedae* produzirem calos com maior massa seca do que nós foliares, tanto em 2,4-D como em ANA, indica que nós cotiledonares podem possuir níveis hormonais que em conjunto com os reguladores exógenos que penetram nos explantes levam a balanços hormonais ótimos para a desdiferenciação e proliferação das células para formar os calos, o que não deve ocorrer com os nós foliares, nas concentrações mais altas de 2,4-D e ANA. Outra possibilidade é que as células dos nós cotiledonares podem ser mais sensíveis à ação dos reguladores de crescimento ou estar em estágios de diferenciação menor, sendo facilmente induzidas à proliferação para a formação de calos. Estudos citológicos mais aprofundados devem ser conduzidos em nós cotiledonares e foliares para investigar que tipos de células destes explantes dão origem aos calos, já que nestes explantes existem tanto as células já diferenciadas dos tecidos do caule como as células meristemáticas das gemas axilares.

Os protocolos desenvolvidos para produção de calos de *T. avellanedae*, com diferentes tipos de auxinas, é relevante para experimentos futuros, uma vez que os reguladores de crescimento podem induzir alterações no metabolismo dos calos ativando vias metabólicas de interesse para a produção de metabólitos secundários. Em culturas de raízes de *Impatiens*

balsamina, por exemplo, os níveis de produção de naftoquinonas variaram de acordo com as variações das concentrações de 6-benziladenina (BA), cinetina e ANA adicionados ao meio de cultura, foram encontrados níveis maiores de naftoquinonas quando foram utilizados BA (2 mg/l) com cinetina (1 mg/l) e ANA (0,1 mg/l), a produção em meios de cultura contendo, por exemplo, concentrações de 0,1 mg/l de ANA e de 0,1 mg/l de cinetina foi gradualmente aumentada com o aumento da concentração de BA (SAKUNPHUEAK e PANICHAYUPAKARANANT, 2010).

Em *T. avellanae*, nos experimentos para induzir formação de ramos *in vitro*, calos também foram induzidos, no presente trabalho, na presença de BAP (6-benzilaminopurina ou 6-benziladenina) a partir de nós apical, foliar e cotiledonar e esses resultados preliminares poderão ser utilizados em futuros experimentos para avaliar a produção de calos e naftoquinonas na presença de citocininas em combinação com auxinas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Martins J. *et al.* (2009) que descreveram, para a espécie *Tabebuia impetiginosa*, a eficiência do BAP em indução de brotações *in vitro* e que concentrações elevadas desta citocinina podem levar à formação de calos na base dos explantes. Porém, os resultados obtidos para *Tabebuia avellanae* nos experimentos com cinetina realizados neste trabalho, sugerem que o uso desta citocinina foi suficientemente alto para inibir a indução de calos ou raízes nas culturas. Silva (2007), em estudos com a espécie *Eucalyptus grandis*, observou que conforme a concentração de cinetina aumentava, num efeito inversamente proporcional, o tamanho dos calos diminuía. Quando o nível de citocinina em relação ao de auxinas é alto ocorre a formação de brotos, já quando o nível de citocinina é baixo em relação ao de auxinas pode ocorrer a formação de raízes; quando as proporções são aproximadamente iguais ocorre a produção de uma massa de calo (KRIKORIAN *et al.*, 1990 apud SILVA, 2007).

A indução de calos para a espécie *Tabebuia avellanae*, nos experimentos com ANA, utilizado de forma isolada, em segmentos de nós cotiledonares e foliares foi eficiente. Contudo, Martins J. *et al.* (2009) em estudos com a espécie *Tabebuia impetiginosa* sugerem que altas concentrações de ANA podem levar à inibição da indução, porém tais resultados não foram observados no presente trabalho, talvez por terem sido utilizadas concentrações mais baixas do que as relatadas para *Tabebuia impetiginosa*.

A variação nos níveis de água produzidos pelos calos, nas diferentes condições de cultura e a partir de diferentes tipos de explantes sugere que os níveis de diferenciação das células dos calos podem ser diferentes, uma vez que a presença de maior nível de água nas células pode estar relacionada com a existência de um maior número de células vacuoladas,

ou de células com vacúolos maiores. Apenas uma análise citológica dos calos originados a partir de diferentes tipos de explantes, em diferentes concentrações de reguladores permitirá uma avaliação mais precisa dos níveis de diferenciação celular. É interessante notar que para um mesmo tipo de explante ocorreu variação no teor de água do calo produzido, dependendo da concentração do regulador de crescimento utilizado. E para uma mesma concentração de regulador o teor de água variou de acordo com o tipo de explante utilizado. As variações nos teores de água dos calos também indicam a possibilidade de variações no metabolismo dos mesmos, aspectos que podem ser investigados, futuramente, através das análises metabolômicas e proteômicas dos calos oriundos de diferentes explantes, em meios de cultura suplementados com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento.

Os protocolos para a produção de calos desenvolvidos para as espécies *T. rooseoalba* e *T. avellanedae* são também relevantes quando se considera a possibilidade de se utilizar os calos em experimentos visando a regeneração de plantas, pois a possibilidade de variação somaclonal pode ampliar a variabilidade genética, com a produção de plantas geneticamente superiores com relação às características ornamentais e medicinais.

6.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA DE CALOS DE *TABEBUIA AVELLANEDAE*

Os resultados da análise do extrato hidroalcoólico dos calos de *Tabebuia avellanedae* são muito promissores por permitirem futuras investigações sobre a identificação dos compostos detectados, a partir das comparações com os padrões específicos, o que não foi possível durante o andamento do trabalho. O fato dos dados indicarem que os compostos identificados na planta adulta estão ausentes nos calos e que a predominância de metabólitos na região de deslocamento de 2-3 min. poderiam ser postulados como precursores dos compostos identificados na planta adulta sugerem que os calos serão sistemas ideais para se estudar a biossíntese do lapachol e de outros metabólitos de interesse. É importante ressaltar que os calos produzidos para as análises fitoquímicas foram originados em uma única condição de cultura e apenas em um único período de cultura, provavelmente resultados mais completos serão obtidos, futuramente, sobre as análises dos calos em diferentes períodos de cultura, em diferentes condições de cultura (com diferentes reguladores de crescimento) e a partir de diferentes tipos de explantes.

Como mencionado, o lapachol e outras naftoquinonas de importância medicinal se acumulam na casca das árvores adultas (UEDA *et al.*, 1994) e talvez os calos produzidos nas condições utilizadas neste trabalho não tenham sofrido o nível de diferenciação necessário para a ativação da via metabólica que leva à produção do lapachol e de outras naftoquinonas. Ueda *et al.* (1994) demonstraram que calos e suspensões celulares de *T. avellanedae* produziram furanonaftoquinonas promissoras, 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naph-tho[2,3-*b*]furan-4,9-diona e 2-acetyl-5-hydroxy-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-diona com ação antitumoral. Esses autores relatam que os calos de *T. avellanedae* foram desenvolvidos em meio de cultura MS suplementado com ácido indolacético (2×10^{-5} M) e cinetina (10^{-5} M), a partir de segmentos de plântulas, sendo cultivados por períodos de 4-5 semanas enquanto que as suspensões celulares foram desenvolvidas a partir desse calos, cultivados no mesmo meio de cultura, porém líquido.

Entretanto, em *Impatiens balsamina* Sakunphueak & Panichayupakaranant (2010) demonstraram a necessidade da diferenciação de raízes a partir de segmentos folhas e do desenvolvimento posterior de cultura dessas raízes para otimizar a produção de naftoquinonas, indicando uma nova estratégia para a produção desses compostos. Demonstraram também que a produção era maior quando as culturas eram iniciadas a partir de folhas de linhagens de plantas altamente produtoras. Este é um aspecto que poderá ser investigado em futuros experimentos com *T. avellanedae*, em que deverão ser avaliados os níveis de produção do lapachol e de outras naftoquinonas, em populações desta espécie, em busca de genótipos altamente produtores, que poderão ser fontes de explantes para os experimentos de produção de calos. A influência do genótipo e dos reguladores de crescimento utilizados pode ter sido a razão da discrepância entre os dados obtidos no presente trabalho e os observados por Ueda *et al.* (1994).

Compostos voláteis também foram detectados nos calos de *T. avellanedae*, o que sugere o potencial desse sistema de cultura *in vitro* para a produção de outras classes de compostos de interesse. Esses resultados confirmam o potencial de aplicação dos protocolos de indução de calos de *T. avellanedae* e *T. roseoalba* desenvolvidos neste trabalho para estudos subseqüentes sobre os metabólitos secundários dessas e de outras espécies de *Tabebuia* e até mesmo de outros gêneros de importância medicinal da família *Bignoniaceae*.

6.4 ANÁLISES DOS CALOS DE *TABEBUIA AVELLANEDAE* EM MO E MET

Dois estágios de desenvolvimento foram analisados nos calos de *T. avellanedae*, baseados nas suas características de idade do explante e tempo de cultivo. O tipo de calo obtido, o grau de diferenciação celular e a capacidade de regenerar novas plantas dependem da origem e idade do tecido escolhido como explante (GEORGE, 2008). Conforme observado neste estudo, os resultados com microscopia óptica demonstraram que a localização de polissacarídeos ácidos, polissacarídeos neutros e proteínas seguem um mesmo padrão nas amostras analisadas. Apesar disso, foi apropriado explorar as semelhanças existentes na distribuição, na composição e na estrutura desses compostos.

As metodologias específicas utilizadas para localizar diferentes tipos de polissacarídeos possibilitaram a localização de compostos ácidos e neutros nos calos de *T. avellanedae*. Os polissacarídeos neutros estavam presentes no meio intracelular como substâncias de reserva e na parede celular, como integrante da arquitetura desta, já os polissacarídeos ácidos foram encontrados na parede celular como componentes da matriz,

Em calos de *T. avellanedae* foi observada uma intensa reação metacromática na parede celular das células constituintes dos calos e em partes de uma matriz extracelular, revelando a presença nestas regiões de polissacarídeos ácidos. De acordo com Bouzon (1999), o fenômeno da metacromasia tem sido útil nos estudos histológicos como indicador de polissacarídeos ácidos.

A parede celular das células de calo também reagiu positivamente com a utilização da coloração PAS, evidenciando a presença de polissacarídeos neutros característicos das moléculas de celulose. Nas células de calos de *T. avellanedae* os polissacarídeos neutros são componentes estruturais da parede celular, e também apresentam a função significativa de reserva citoplasmática na forma de grãos de amido. A reação de PAS é utilizada para a identificação de polissacarídeos neutros, requerendo a presença de grupos 1,2 glicol, que são oxidados para aldeídos pelo ácido periódico (TRICK e PUESCHEL 1990, apud BOUZON, 2006). Em todas as amostras analisadas foi possível a observação de células contendo grãos de amido, uns de forma esférica e outros mais alongados. A forma do grão de amido em grande parte é determinada pelo conteúdo de amilose, pois o grão de amido se torna mais esférico à medida que ocorre um aumento de amilose em relação ao de amilopectina. O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas superiores, existindo em duas formas: amilose e amilopectina (KERBAUY, 2008). Os grãos de amido têm sido apontados como

indicadores de processos embriogênicos, conforme estudos de Ribas *et al.* (2005) e Steiner *et al.* (2009) com as espécies *Aspidosperma polyneuron* e *Araucária angustifolia*, respectivamente. Estes autores sugerem a relação da presença de grãos de amido com processos de embriogênese somática *in vitro*.

Quando coradas com CBB, as células de calos de *Tabebuia avellanedae* evidenciaram os componentes protéicos distribuídos pelo citoplasma, indicando síntese de organelas celulares, característica presente em células durante o processo divisão e multiplicação. Conforme Bouzon (1999), as proteínas são os principais constituintes das organelas celulares, e estão presentes no citoplasma como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas. A análise no citoplasma das células de calos em microscopia óptica verificou uma baixa incidência de proteínas na forma de grânulos dispersas no interior celular, provavelmente relacionado com a presença de um grande vacúolo diminuindo a observação de organelas citoplasmáticas condensadas na parte parietal do citoplasma.

Várias proteínas fazem parte da parede celular vegetal, apesar de ocorrerem em menor proporção (cerca de 10%). Há duas classes principais: as proteínas estruturais e as enzimas. Algumas proteínas estruturais da parede celular parecem ter função no controle da extensão e expansão celular; no caso das enzimas, existem muitos estudos sobre suas estruturas e funções, além de terem sido clonados diversos genes que codificam para várias hidrolases de polissacarídeos da parede celular. Durante a expansão normalmente a espessura da parede se mantém, o que sugere que, ao mesmo tempo em que ocorre intussuscepção, novas camadas de parede são depositadas sobre a parede preexistente. Todo este processo está relacionado à ação das auxinas em tecidos vegetais, e dentre os efeitos fisiológicos das auxinas estão a divisão, crescimento e diferenciação celular. A auxina, além de induzir a acidificação da parede celular e conseqüentemente afrouxamento, induz outros processos importantes que proporcionam a continuidade do crescimento da célula como: os aumentos na absorção de solutos osmóticos e atividade de certas enzimas relacionadas com a biossíntese de polissacarídeos de parede (KERBAUY, 2008).

Apesar de não terem sido descritos resultados sobre o potencial embriogênico da auxina 2,4-D sobre as culturas de calos na espécie *T. avellanedae*, estudos destes efeitos também poderiam ser conduzidos como alternativa para otimizar o processo multiplicação *in vitro* de germoplasma vegetal. Flores (2006) em estudos com cultura de calos para produção de metabólitos secundários em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* utilizou o corante carmim acético para caracterização das culturas e encontrou resultados semelhantes aos de Cangahuala-Inocente *et al.* (2007) utilizando tecidos somáticos da espécie *Acca sellowiana*,

sobre a utilização da auxina 2,4-D na indução tanto de culturas embriogênicas como não embriogênicas.

Nas amostras de calos com 40 dias de cultivo advindo de explantes de plântulas de *T. avellanadae*, em secções tratadas com azul de toluidina AT-O com idade de 4 meses, foram encontrados tricomas unicelulares apresentando tamanho de 40µm e extremidade afilada. Os tricomas tectores são sistemas úteis para estudar a diferenciação celular e desenvolvimento em níveis moleculares (WAGNER *et al.*, 2004). Segundo o autor, aos tricomas tectores são atribuídas diversas funções, dentre elas a regulação da temperatura do vegetal, aumento da reflexão da luz, incluindo raios ultravioleta, estabelecimento e dispersão de sementes, diminuição da perda de água, homeostase epidérmica, absorção de água e nutrientes e guia para polinizadores. Segundo Empinotti e Duarte (2008), os tricomas ainda são empregados em finalidades taxonômicas e na morfodiagnose de drogas vegetais. A presença de tricomas está relacionada à característica da planta de efetuar a regulação hídrica, conforme observaram Abbade *et al.* (2009) em análises com folhas de plântulas de *Tabebuia roseoalba* cultivadas *in* e *ex vitro*. Os autores acima relataram que o maior número de tricomas nas folhas *ex vitro* também contribui para diminuir o excesso de transpiração.

Foram encontrados no presente estudo apenas tricomas tectores unicelulares e de formato cônico. Souza e Oliveira (2004), em análise da morfo-anatomia de *T. avellanadae* e *T. chrysotricha*, observaram que as duas plantas apresentam tricomas tectores, porém, estes se diferem com relação ao número de células e ao formato, sendo que em *T. avellanadae*, eles têm tamanho reduzido, extremidade afilada e são unicelulares; já os tricomas tectores de *T. chrysotricha* são pluricelulares, alongados e ramificados. Em trabalho análogo, Ortolani *et al.* (2008) analisaram a morfo-anatomia de plântulas de *Cybistax antisiphilitica*, encontrando tricomas glandulares uni e pluricelulares de formatos variados. Costa *et al.* (2004) também encontraram em cotilédones foliáceos da espécie *Tabebuia ochraceae* tricomas tectores simples ou estrelados.

As células formadoras de calos jovens mostraram organização subcelular típica de células indiferenciadas com destaque para a presença de proplastídeos. De acordo com Taiz e Zeiger (2004), os proplastídeos não possuem clorofila, apresentam pouca ou nenhuma membrana interna e um conjunto incompleto de enzimas necessárias para realizar a fotossíntese.

Tanto as células de calos jovens analisadas quanto as células de calos maduros apresentavam a presença de vacúolo. Appezzato-da-Glória e Machado (2004) afirmaram que em geral, as células vacuolizadas se dividem de forma desigual, dando origem a células-filhas

de diferentes tamanhos. Os calos neste estudo foram formados por inúmeras divisões celulares, que podem conduzir a instabilidade genética do material. Cabe mencionar que principalmente durante a fase inicial de crescimento de calos, conforme mencionado por Fernando *et al.* (2007), pode ocorrer o processo de fragmentação nuclear. Appezzato-da-Glória e Machado (2004) analisaram aspectos ultraestruturais dos calos de *Bauhinia forficata* e localizaram fragmentos de cromatina dispersos no citoplasma, indicando a ocorrência deste processo.

Nogueira *et al.* (2007) estudaram calos de *Byrsonima intermédia* e através de análise do material em MEV, constataram que foi possível a visualização nítida de mudança do formato celular ao longo do tempo de exposição ao 2,4-D, supondo que a presença desta auxina fosse fator crucial para a sinalização de desdiferenciação celular e conseqüente retomada de características meristemáticas, favorecendo a embriogênese somática. Já com relação à análise em MET obtida no cultivo inicial dos calos, os autores notaram que as células apresentavam núcleos desorganizados, mitocôndrias com poucas cristas, pouco retículo endoplasmático e complexo de Golgi, e presença de amiloplastos. No presente estudo, assemelhando-se a pesquisa descrita acima, também foram encontrados os mesmos constituintes celulares. Os corpos de Golgi estão dispostos em torno do amiloplasto ou próximos das mitocôndrias sugerindo uma interação metabólica. Esta interação sugere que este material encontra-se com características indicativas de alta atividade metabólica, de acordo com Appezzato-da-Glória e Machado (2004).

A análise estrutural e ultra-estrutural das células de calo vem possibilitando a compreensão da produção de metabólitos secundários utilizados com interesses medicinais, principalmente no desenvolvimento e extração de compostos como o Lapachol. Os conhecimentos adquiridos com estudos como este, sugerem investigar vias de sinalização utilizando como percussor o ácido chiquímico na elicitação das culturas celulares *in vitro*.

7. CONCLUSÕES

As avaliações dos parâmetros tempo e temperatura de armazenamento sobre a conservação da viabilidade das sementes nas espécies *T. roseoalba* e *T. pentaphylla*, sugerem a utilização dos tratamentos nitrogênio líquido (-196°C), geladeira (5°C) e freezer (-20°C), devido aos melhores resultados de germinação máxima encontrados, sendo que tais tipos de armazenamento não causam anormalidades no desenvolvimento posterior das plântulas. As sementes de *T. roseoalba*, após o processo de criopreservação, podem ser mantidas em temperatura ambiente por uma semana sem que a viabilidade seja prejudicada enquanto que as sementes de *T. pentaphylla* por até três semanas. Este resultado é importante e serve de referência para facilitar o intercâmbio de germoplasma. Quando se considera um banco de sementes no qual usualmente as sementes são conservadas em nitrogênio líquido, estas teriam a capacidade de serem remetidas pelo correio para outros locais em temperatura ambiente e poderão ser criopreservadas novamente.

Sistemas de cultura de calos podem ser induzidos para *T. roseoalba* e *T. avellanadae* a partir de diferentes tipos de explantes e com diferentes reguladores de crescimento. Para o desenvolvimento de sistemas de cultura de calos de *T. roseoalba* deve ser utilizado o 2,4-D nas concentrações de 1,25 e 2,5 µM e segmentos de cotilédone e hipocótilo e para *T. avellanadae* recomenda-se utilizar a concentração de 1,25 µM desta auxina e nó cotiledonar, segmentos de cotilédone e hipocótilo. Em *T. avellanadae* calos podem ser induzidos com sucesso em nós cotiledonares e foliares também em ANA e AIB, apesar do crescimento ser inferior do que em 2,4-D. Os calos da espécie *T. avellanadae* cultivados com 1,25 µM da auxina 2,4-D eram friáveis, translúcidos e apresentavam predominantemente em sua superfície a conformação estrutural de aspecto globular. As células formadoras de calos foram caracterizadas como indiferenciadas, tendo grãos de amido como o principal composto de reserva acumulado nestas células. A presença de grande vacúolo, citoplasma periférico, mitocôndrias ao redor do envelope nuclear, corpos de Golgi, riqueza em retículos endoplasmáticos rugosos, inúmeros ribossomos livres e grandes nucléolos caracterizam uma intensa atividade metabólica e possivelmente secretora. A análise fitoquímica dos calos indicou a ausência dos compostos encontrados nas cascas, mas foram detectados metabólitos que podem ser precursores desses compostos além de que também foram detectados metabólitos minoritários, possivelmente compatíveis com os derivados dos lapachol.

Sistemas de micropropagação de plantas de *T. avellanae* podem ser iniciados a partir da cultura de nó apical, nó foliar e nó cotiledonar na ausência ou presença de concentrações de BAP variando de 1,25 μM a 5 μM , porém a concentração mais baixa é recomendada para evitar possíveis efeitos tóxicos sobre os explantes.

Os experimentos realizados permitiram desenvolver protocolos eficientes de conservação de sementes, incluindo a criopreservação, de *T. roseoalba* e *T. pentaphylla*, protocolos de micropropagação para *T. avellanae*, protocolos de indução de calos para *T. avellanae* e *T. roseoalba*, e a detecção de metabólitos secundários em calos de *T. avellanae*. Tais resultados promissores permitirão aperfeiçoar os sistemas de conservação de germoplasma *ex vitro* e *in vitro* e a produção de metabólitos secundários de interesse dessas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L. C. **Aspectos do cultivo *in vitro* do Ipê-Branco**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, 2008, 200 p.

ABBADE, L.; PAIVA, P.; PAIVA, R.; CASTRO, E.; CENTOFANTE, A.; OLIVEIRA, C. Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo Alba* (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo ex vitro e *in vitro*. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, Maringá, jul. 2009. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/1937/1937>>. Acesso em: 31 jan. 2010.

ALMEIDA, E. R.; SILVA FILHO, A. A.; SANTOS, E. R.; LOPES, C. A. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal Ethnopharmacology**, Ireland, v. 29, n. 2, p. 239-241, 1990.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 2, p. 57-59, 2002.

APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; MACHADO, S. R. Ultrastructural analysis of in vitro direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, set. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042004000300004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01 fev. 2010.

APG (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of Flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, p. 399-436, 2003.

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

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BIODIVERSITAS. **Lista das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Belo Horizonte, 2005. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/destaque_flora.asp>. Acesso em: 10 jan. 2010.

BITTENCOURT JR, N. S. **Auto-incompatibilidade de ação tardia e outros sistemas reprodutivos em Bignoniaceae**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Campinas-SP, 2003, 286 p.

BORDIGNON, S. A. L.; MENTZ, L. A. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) - **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, p.147-162, 1999.

BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

54052008000400008&lng=en&nrm= iso>. Acesso em: 09 jun. 2010. doi: 10.1590/S0100-54052008000400008.

BOUZON, Z. L. **Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales-Rhodophyta)**. 1993. 66 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 1993.

BOUZON, Z. L. **Histoquímica e ultra-estrutura da espermatogênese e carpoporogênese de algas gracilarióides (Rhodophyta)**. 1999. 116 f. Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BOUZON, Z. L.; MIGUENS, F.; OLIVEIRA, E. C. Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). **Cryptogamie Algologie**, v.21, p. 33-47, 2000.

BOUZON, Z. L. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.2, p.229-238, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042006000200004> Acesso em: 26 out. 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Brasília: Ibama, 2008. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-florestais/wp-content/files/IN-MMA_06-2008.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade brasileira**. Brasília: Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2010. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=72&idMenu=2338>> . Acesso em: 19 fev. 2010.

BYEON, S. E.; CHUNG, J. Y.; LEE, Y. G.; KIM, B. H.; KIM, K. H.; CHO, J. Y. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanadae*. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 119, p. 145-152, 2008.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook. F. Ex. S. Moore. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 609-617, 2003.

CAMILLO, J. **Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo (*Cochlospermum regium* Mart. ex Schrank Pilger – Cochlospermaceae)**. 2008. 95f. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 87-89, 2007.

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

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 640 p.

COSTA, M. E.; SAMPAIO, D. S.; PAOLI, A. A. S.; LEITE, S. C. A. L.. Poliembrião e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042004000200017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 out. 2009.

DAVIES, P. J. The plant hormones concept: concentration, sensitivity and transport. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 13-38, 1995.

DEGAN, P.; AGUIAR, I. B.; SADER, R.; PERECIN, D.; PINTO, L. R. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental.** Campina Grande, v. 5, n. 3, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662001000300021&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 Out. 2009. doi: 10.1590/S1415-43662001000300021.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELOET, L. A. 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, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542008000600002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 09 out. 2009. DOI: 10.1590/S1413-70542008000600002.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. **Influência do sombreamento sobre o crescimento de mudas de algumas essências nativas, e suas implicações ecológicas e silviculturais.** Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Botucatu, n. 43/44, p. 1-10, 1990.

EMPINOTTI, C. B.; DUARTE, M. R. Estudo anatômico de folha e caule de *Elephantopus mollis* Kunth (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, n.1, p. 108-116, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000100020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 out. 2009.

EYONG, K. O.; KUMAR, P. S.; KUETE, V.; FOLEFOG, G. N.; NKENGFAK, E. A.; BASKARAN, S. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5387-5390, 2008.

FAVARO, O. C. N.; OLIVEIRA, M. M.; ROSSINI, M. A. A.; KAMAKURA, C. R.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.. Seleção por meio de células KB de substâncias e extrato potencialmente ativo em quimioterapia do câncer. **Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 3, p. 217-224, 1990.

FERES, J. M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação.**

Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p. 142, 2009.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F; **Germinação do Básico ao Aplicado**. Porto Alegre: ARTMED, p.251-252, 2004.

FERNANDO J. A.; VIEIRA M. L. C.; MACHADO S. R. APPEZZATO-DA-GLÓRIA B. New insights into the in vitro organogenesis process: the case of Passiflora. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Netherlands, v. 91, n. 1 p. 37–44, 2007. Disponível em: <<http://www.lcb.esalq.usp.br/publications/articles/2007/2007pctocv91n1p37-44.pdf>> Acesso em: 24 out. 2009.

FLORES, R.. **Cultura de tecidos e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* E *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 168 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

GAHAN, P. B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. Academic Press. London, 1984. 301p.

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

GENTRY, A. H. **Bignoniaceae. Part I (Tribes Crescentiae and Turretiae)**. Flora Neotropica, v.25, p. 1-130, 1980.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK G. J. **Plant propagation by tissue culture**. The Background. 3. ed. Dordrecht: Springer, v. 1, 2008, 501 p.

GLUFKE, C. **Espécies florestais recomendadas para recuperação de áreas degradadas**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 1999. 48 p.

GOEL, R. K.; PATHAAK, N. K.; BISWAS, M.; PANDEY, V. B.; SANYAL, A. K. Effect on lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis* on experimental peptic ulcer and gastric secretion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S.l.] v. 39, n. 2, p. 138-140, 1987.

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

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; AGUILAR, N.; ÁVILA, T. Germination and embryo rescue from *passiflora* species seeds post-cryopreservation. **CryoLetters**, Londres, v. 30, p. 55-63, 2009.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J. A.; RAMÍREZ-GARDUZA, F.; ROBERT, M. L.; O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; PEÑA-RAMÍREZ, Y. J. Adventitious shoot induction from adult tissues of the tropical timber tree yellow Ipê primavera (*Tabebuia donnell-smithii* rose [Bignoniaceae]). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Heidelberg, v. 46, 2010. DOI: 10.1007/s11627-010-9304-9.

GORDON-MILLS, E. M.; McCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: HARVEY, M. J. & McLACHLAN, J. (eds) *Chondrus crispus*. Nova Scotian Institute of Science, Halifax. p. 111-133, 1973.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA-CNPq, p. 183-260, 1990.

GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. **Taxonomic Revisions in the Polyphyletic Genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae)**. Systematic Botany, v. 32, n. 3, p. 660-670, 2007.

HAINES, R. **Biotechnology in Forest tree improvement with special reference to developing countries**. Rome: FAO/IBPGR Forest Paper, n. 118. 1994. 230p.

HAMILTON, K. N.; ASHMORE, S. E.; PRITCHARD H. W. Thermal analysis and cryopreservation of seeds of australian wild *Citrus* species (RUTACEAE): *Citrus Australasica*, *C. Inodora* and *C. Garrawayi*. **CryoLetters**, Londres, v. 30, p. 142-147, 2009.

HELLMANN M. E.; MELLO J. I. O.; FIGUEIREDO-RIBEIRO R. C. L.; BARBEDO C. J. Freezing tolerance in seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) as influenced by the initial water content. **Revista Brasileira de Botânica**. Sao Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-101; 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042006000100009&lng=en&nr m=iso>. Acesso em: 07 out. 2009. doi: 10.1590/S0100-84042006000100009.

HIGA, T. C. **Morfogênese e Conservação *in vitro* para *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae)** 2006. 137 f. Dissertação. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Florianópolis, 2006.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Technical Bulletin, 1. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55 p.

ISTA. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. **Seed Science and Technology**, v. 13, p. 356-513.1985.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 2002.

KAGEYAMA, P. Y.; MARQUEZ, F. C. M. **Comportamento de sementes de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial: gênero *Tabebuia***. In: Reunion sobre problemas en semillas forestales tropicales, 1980. San Felipe-Bacalar, México: INIF, Relatório, v. 1, p. 347-352, 1981.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2. ed., 2008. 431p.

KUMAR, M. R. S.; AITHAL, K.; RAO, B. N.; UDUPA, N.; RAO B. S. S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 242-250, 2009.

LYSTVAN, K.; BELOKUROVA, V.; SHELUDKO, Y.; INGHAM, J. L.; PRYKHODKO, V.; KISHCHENKO, O.; PATON, E.; KUCHUK, M. Production of bakuchiol by in vitro systems of *Psoralea drupacea* Bge. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 101, n. 1, p. 99-103, 2010. DOI: 10.1007/s11240-009-9657-0

LIMA V. V. F.; VIEIRA D. L. M.; SEVILHA A. C.; SALOMÃO A. N. Germinação de espécies arbóreas de floresta estacional decidual do vale do rio Paraná em Goiás após três tipos de armazenamento por até 15 meses. **Biota Neotropica** v. 8, n. 3, p. 89-97; 2008.

Disponível em:

<http://www.biotaneotropica.org.br/v8n3/pt/abstract?article+bn01008032008>. Acesso em: 04 out. 2009. doi:10.1590/ s1676-06032008000300008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4° ed. São Paulo, Nova Odessa, Instituto Plantarum, 1992. 352 p.

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

_____. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. São Paulo, Nova Odessa, Instituto Plantarum, v. 1, 2000, 352p

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M.A.V; BACKER, L. B. **Árvores exóticas do Brasil**. Instituto Plantarum. Nova Odessa, SP. 2003. 384 p.

MACHADO, C. F.; OLIVEIRA, J. A.; DAVIDE, A. C.; GUIMARÃES, R. M. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl)Nicholson). **Cerne**, v. 8, n. 2, p. 17-25, 2002.

MAEDA, J. A.; MATHES, L. A. F. Conservação de Sementes de Ipê. **Bragantia**, v. 43, n. 1, p. 51-61, 1984.

MARQUES, M. A.; RODRIGUES, T. J. D.; VALERI S. V.; MALHEIROS E. B. Comportamento germinativo de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart.) Standl. secadas em câmara seca, armazenadas em diferentes ambientes e submetidas a sete níveis de potencial osmótico. **Científica**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 127-133, 2004.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; ANDRADE, A. C. S.; SALES, W. R. M. Conservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 71-76, 2009.

MARTINS, J. P. R.; BATISTA, T. R.; RODRIGUES L. C. de A.; NOGUEIRA, D. A.; PAIVA, R.; BARBOSA, S.; SANTOS, B. R. Multiplicação *in vitro* de explantes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (MART.) STANDL.). **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço, 2009.

McCULLY, M. E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences** 175: 702-711, 1970.

MEDEIROS A. C. S.; CAVALLARI D. A. N. Conservação de germoplasma de Aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.) I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196°C). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.14, n. 1, p. 73-75, 1992.

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

MORATELLI, E.; VIANA, A. M. **Efeito da criopreservação na germinação e crescimento inicial de plântulas de *Tabebuia avellanadae* (Bignoniaceae)**. 2003. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Florianópolis, 2003.

MORATELLI, E. M. **Disponibilidade de água e de luz no desenvolvimento e colonização micorrízica de *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb. (Bignoniaceae)**. 2006. 65p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Florianópolis, 2006.

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

NASIM, S. A.; DHIR, B.; KAPOOR, R.; FATIMA, S.; MAHMOODUZZAFAR; MUJIB, A. Alliin production in various tissues and organs of *Allium sativum* grown under normal and sulphur-supplemented *in vitro* conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 101, n. 1, p. 59-63, 2010. DOI: 10.1007/s11240-009-9664-1.

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

NOGUEIRA, R. C.; Paiva, R.; Porto, J. M. P.; Nicioli, P. M.; Stein, V. C.; Deuner, S.; Alves, E. Análise Ultra-estrutural de Calos Embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Nota Científica, **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 48-50, jul. 2007. Disponível em:<http://www6.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/90/86> Acesso em: 26 out. 2009.

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

O'BRIEN, T.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Temarcarphi Pty Ltda, 1981. 45p.

OLIVEIRA, C. G. T.; MIRANDA F. F.; FERREIRA, V. F.; FREITAS, C. C.; RABELLO, R. F.; CARBALLIDO, J. M.; CORRÊA, L. C. D. Synthesis and antimicrobiol evaluation of 3-

hydrazino-naphthoquinones as analogs of lapachol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 339-345, 2001.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALAHO, M. L. M.; SILVA, T. T. A.; BORGES, D. I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. - Bignoniaceae. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, 2005. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-7054200500300020&lng=en&Nrm=iso>. Acesso em 01 Nov. 2009. doi: 10.1590/S1413-70542005000300020.

ORTOLANI, F. A. **Morfo-anatomia, citogenética e palinologia em espécies de ipês (Bignoniaceae)**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista. Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, Jaboticabal, São Paulo. 2007.

ORTOLANI, F. A.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J. R.; MORO, F. V.; DAMIÃO FILHO, C.F. Morfo-anatomia de plântulas e número cromossômico de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae). **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 22, n. 2, jun. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062008000200005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 31 jan. 2010.

OZDEN-TOKATLI, Y.; OZUDOGRU, E. A.; GUMUSEL, F.; LAMBARDI, M. Cryopreservation of *Pistacia* spp. Seeds by dehydration and one-step freezing. **CryoLetters**, Londres, v. 27, p. 169-178, 2006.

PEREIRA, J. E. S.; COSTA, F. H. da S.; GUEDES, R. S. **Uso e aplicações biotecnológicas do cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas**. In: GONCALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. de (Ed.). Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, cap. 13, p. 221-296, 2009.

PILATTI, F. K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E. E.; VIANA, A. M. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 17p. Heidelberg Ago. 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/mp476g26v47571w2/fulltext.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2010.

PINTO, M. M.; SADER, R.; BARBOSA, J. M. Influência do tempo de secagem e do armazenamento sobre a viabilidade das sementes de Ipê-rosa. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 37-47, 1988.

PITA, J. M.; SANZ, V.; ESCUDERO, A. Seed cryopreservation of seven Spanish native pine species. **Silvae Genetica**, v. 47, n.4, p. 220-223, 1998.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas Nativas potenciais para sistemas agroflorestais em Mato Grosso do Sul**. In: Seminário Sistemas Agroflorestais e Desenvolvimento Sustentável. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 2003.

PORTO, P. M. P. **Potencial Embriogênico e Organogênico em Explantes de ipê – branco**. Dissertação (Agronomia), Universidade Federal de Lavras, 2009.

QUEIROZ, M. L. S.; VALADARES, M. C.; TORELLO, C. O.; RAMOS, A. L.; OLIVEIRA, A. B.; ROCHA, F. D.; ARRUDA, V. A.; ACCORCI, W. R. Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* bark extract and β -lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, v. 117, n. 2, p. 228–235, 2008.

REED, B.M.; SCHWANK, S.; SHALA, R. Pear Seed retain Viability after Liquid Nitrogen Immersion. **Hortscience**, v. 36, n. 6, p.1121-1122, 2001. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/4630/Seed/HortScience361121-1122%282001%29PearSeedCryo.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Bignoniáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1974. 172 p.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Madeiras do Brasil**. Florianópolis, Lunardelli, 1979, 320 p.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

RIBEIRO, K. A. L.; CARVALHO, C. M.; MOLINA, M. T.; LIMA, E. P.; LÓPEZ-MONTERO, E.; REYS J. R.; OLIVEIRA, M. B.; PINTO A. V.; SANTANA, A. E.; GOULART, M. O. Activities of naphthaquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, Alagoas, v. 111, n. 1, p. 44-50, 2009.

SAKUNPHUEAK, A.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Effects of donor plants and plant growth regulators on naphthoquinone production in root cultures of *Impatiens balsamina*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 102, n. 1, p. 9-15, 2010. DOI: 10.1007/s11240-010-9698-4

SALOMÃO A. N. Respostas de sementes de espécies tropicais à exposição ao nitrogênio líquido. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 133–138; 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202002000200008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 out. 2009. doi: 10.1590/S1677-04202002000200008.

SANTOS, D. L.; SUGAHARA, V. Y.; TAKAKI, M. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. E *Tabebuia roseoalba* (Ridl) Sand – Bignoniaceae. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 1, p. 87-92, 2005.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.20, p.60-65, 2001.

SILVA, A.; FIGLIOLIA, M. B.; AGUIAR, I. B.; PERECIN, D. Liofilização e armazenamento de sementes de ipê-rosa (*Tabebuia heterophylla* (A.P. Candolle) Britton) –

Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Sementes**. Viçosa, v. 23, n. 1, p. 252-259, 2001. Disponível em: <<http://www.abrates.org.br/revista/artigos/2001/v23n1/artigo35.pdf>>. Acesso em 22 Ago. 2009.

SILVA, H. R. **Morfologia e lignificação de calos de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) sob efeito de cinetina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético**. 2007. 62f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

SILVA JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V.; FERNANDES, M. C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; LOPES, F. A.; SIMONE, C. A.; ANDRADE, C. K. Z.; PINTO, A. V.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, S. L. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 5030-5038, 2008.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F., SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, maio 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000300019&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 01 Set. 2009. doi: 10.1590/S0100-40422003000300019.

SILVA, R. L.; SOUSA, C. M.; SANTOS, R. P.; MIRANDA, R. M. Regeneração *in vitro* de explantes de segmentos nodais de *Catharanthus roseus* sob diferentes combinações de auxina e citocinina. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 50-54, 2003.

SILVA, R. S. F.; COSTA, E. M.; TRINDADE, U. L. T.; TEIXEIRA, D. V.; PINTO, M. C. F. R.; SANTOS, G. L.; MALTA, V. R. S.; SIMONE, C. A.; PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. Synthesis of naphthofurans_ nquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 526-530, 2006.

SIMÕES, T. **Indução de calos em *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart. e efeito de períodos e temperatura sobre a germinação de *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl. e *Tabebuia pentaphylla* Hemsl.** 2009. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Florianópolis, 2009.

SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; AZEVEDO, R. L.; MENDES L. N.; GRAZZIOTTI, P. Produção de mudas de ipê-roxo inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 15, n. 2, 2003.

SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Tabebuia rosea* (Bertoloni) a.p. de Candolle (Bignoniaceae), uma espécie exótica com potencial invasor. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 2, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622007000200005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 08 Set. 2009. doi: 10.1590/S0100-67622007000200005.

SOOD, H. AND CHAUHAN, R.S. Biosynthesis and accumulation of medicinal compound, Picroside I, in cultures of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 100, n. 1, p. 113-117, 2010. DOI: 10.1007/s11240-009-9618-7

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII.** Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum, 2005, 640 p.

SOUZA, L. A.; OLIVEIRA, J. H. G. Morfologia e anatomia das plântulas de *Tabebuia avellanadae* Lor. Ex Griseb e *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl. (Bignoniaceae) **Acta Scientiarum.** Biological Sciences, v. 26, n. 2, p. 217-226, 2004.

SOUZA, T. V. **Efeito de diferentes condições de armazenamento sobre a germinação e o crescimento inicial de plantas de *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Grisebach (Bignoniaceae)** 2007. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Florianópolis, 2007.

SPANGLER, R. E. & OLMSTEAD, R. G. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences rbcL and ndhF. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 86, p. 33-46, 1999.

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, Elsevier, v. 26, p. 31-43, 1969.

STANWOOD P. C.; BASS L. N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, p.423-437, 1981.

STANWOOD P. C.; ROSS E. E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **HortScience**, v. 14, p. 530-628, 1979.

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

STATISOFT, Inc. **STATISTICA** (data analysis software system), version 6.0. Disponível em: <www.statsoft.com>. 2001.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten:** ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK. 2009. 163 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 627-633, 2004.

TARRÉ E.; PIRES B. B. M.; GUIMARÃES A. P. M.; CARNEIRO L. A.; FORZZA R. C.; MANSUR E. Germinabilidade de sementes de espécies endêmicas de *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. f. species (Bromeliaceae). **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 777-783; 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062007000400003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 out. 2009. doi: 10.1590/S0102-33062007000400003

TRAN, T.; SAHEBA, E.; ARCERIO, A. V.; CHÁVEZ, V.; LI, Q.; MARTINEZ, L. E.; PRIMMA, T. P. Quinones as antimycobacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4809-4813, 2004.

- THORPE, T. A.; KUMAR, P. P. Cellular control of morphogenesis. In: AHUJA, M. R. (Ed.) **Micropropagation of woody plants**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.11-29, 1993.
- UEDA, S.; UMEMURA, T.; DOHGUCHI, K.; MATSUZAKI T, TOKUDA H, NISHINO H, IWASHIMA A. Production of anti-tumour-promoting furanonaphthoquinones in *Tabebuia avellaneda* cell cultures. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2 p. 323-325, 1994.
- VIANA, A. M.; MAZZA, M.C.; MANTELL, S.H. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian Rain forest. In: BENSON, E.E. (ed.). **Plant Conservation Biotechnology**. Taylor & Francis, London, p. 277-299, 1999.
- VIT, P. *Tabebuia rosea* (BERTOL.) DC. Ficha botânica de interes apícola em Venezuela, nº 7 aparate. **Revisit de la Faulted de Farmacia**, v. 46, n. 1, p. 57-59, 2004.
- WAGNER, G. J.; WANG, E; SHEPHERD, R. W. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. **Annals of Botany**, v.93, p. 3-11, 2004. Disponível em: <<http://aob.oxfordjournals.org/cgi/reprint/93/1/3>>. Acesso em: 4 ago. 2009.
- WETZEL, M. M. V. S.; REIS, R. B.; RAMOS, K. M. **Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2003. 5 p.
- WIELEWICKI, A. P.; LEONHARDT, C.; SCHLINDWEIN, G.; MEDEIROS, A. C. S. Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 3, p. 191-197, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222006000300027&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 mai. 2009. doi: 10.1590/S0101-31222006000300027.
- YAMAMOTO, M. A.; SOBIERAJSKI, G. R.; SILVA FILHO, D. F.; COUTO, H. T. Z. Árvores matrizes de *Tabebuia pentaphylla* (L.) Hemsl. (Ipê de El Salvador) e *Caesalpinia pluviosa* DC. (Sibipiruna) em área urbana, selecionadas por meio de índice de importância. **Revista da sociedade brasileira de arborização urbana**, Piracicaba, v. 2, n. 3, 2007. Disponível em: <http://www.revsbau.esalq.usp.br/artigos_cientificos/artigo24.pdf>. Acesso em 23 Out. 2009.
- YAMASHITA, M.; KANEKO, M.; TOKUDA, H.; NISHIMURA, K.; KUMEDA, Y.; IIDA, A. Synthesis and evaluation of bioactive naphtho_ quinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellaneda*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6286-6291, 2009.
- ZANOTTI R. F.; MOTTA L. B.; SILVA A. I. S.; LEITE I. T. A.; CUZZUOL G. R. Crescimento inicial de plântulas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil) provenientes de bancos de germoplasma. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, MG; 2007. Disponível em: <<http://seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/280.pdf>>. Acesso em 26 Out. 2009.