



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



ZAFIRA EVELMA DA ROCHA GURGEL

Micropropagação e conservação de
Comanthera mucugensis Giul. subsp. *mucugensis*

Feira de Santana, BA

2017

ZAFIRA EVELMA DA ROCHA GURGEL

Micropropagação e conservação de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana
Co-orientadora: Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani

Feira de Santana, BA

2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alone Lima Brito

Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Profa. Dra. Franciane Tavares Braga

Prof. Dra. Cristina Ferreira Nepomuceno

Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana
Orientador e presidente da banca

Feira de Santana, BA

2017

Ao meu grande Amor, amigo e companheiro: Dudu,
meu maior incentivador. Aos meus pais, Vera e
Maninho, pelo dom da vida e apoio incondicional.
A vocês que trazem a tranquilidade nos
momentos de turbulência.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que me ensinaram muito, mas sem dúvidas o mais importante foi a cooperação. Sem as colaborações que tive não teria conseguido chegar até aqui e por isso tenho tanto a agradecer.

À Universidade Estadual de Feira de Santana pela oportunidade de cursar a pós-graduação em Biotecnologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

À Universidade Federal da Bahia, através do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Biologia, pela estrutura física que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Dr. José Raniere Ferreira de Santana por aceitar me orientar, mesmo à distância, e pelas suas contribuições.

À professora Moema Cortizo Bellintani por sempre ter acreditado em mim e ter disponibilizado toda a estrutura do seu laboratório para o desenvolvimento desse trabalho. Além disso, agradeço por ter sido mais do que co-orientadora, foi amiga e ajudou a solucionar todos os percalços desse caminho. Com você aprendi que mesmo o trabalho mais árduo quando realizado com amor e alegria torna-se mais leve e fácil.

À professora Dra. Sheila Vitória Resende por ser sempre amiga, solícita e por ter me ensinado sobre a dinâmica em um laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais

À professora Dra. Alone Lima-Brito por ser sempre solícita e por disponibilizar sementes para o início desse projeto.

À professora Dra. Kelly Leite pela infraestrutura necessária para a análise anatômica no Laboratório de Anatomia e Identificação de Madeiras (LAVIM).

À convivência com a equipe do LCTV- UFBA que me deu a oportunidade de saber o real significado de trabalhar em equipe. Dessa equipe, quatro pessoas são muito importantes na minha vida: Gabi (Gabriela), Gaby (Gabrielle), Mai (Maíra) e Nazaré. O destino se encarregou de nos separar fisicamente, mas para sempre estaremos ligadas pelos momentos felizes e difíceis que passamos juntas sempre regados a café ou saboreando acarajé. Os conselhos e aprendizado que tive com vocês seguirão sempre comigo. Naza, além da amizade, contribuiu diretamente para a finalização desse trabalho. À todas vocês obrigado por existirem em minha vida.

À todos meus colegas do LCTV-UFBA que estão ou que passaram por lá como Rosane (Bole), Jéssica, Gustavo, Adiele, Larissa, Izabela, Hédina, Nina, Lucas, Tiago, Cássia, Daniel e Laila, seja por me ensinarem a difícil missão de orientar ou pela troca de conhecimento, meu muito obrigado! Em especial gostaria de agradecer a Eva por sempre ser solícita e estar disposta a ajudar mesmo quando estava sem tempo para dar conta das próprias coisas.

A Flávia pela amizade e por tantas vezes ter me acolhido e me ajudado a resolver questões burocráticas em Feira de Santana.

A Nilton, guia do Projeto Sempre-Viva, por ter coletado as sementes de *C. mucugensis* que foram tão importantes para a última etapa desse trabalho.

Aos colegas do LAGEV – UFBA pela convivência e ajuda com equipamentos.

A Carlos Eduardo, Dudu, pelo incentivo diário, compreensão, por ser meu melhor amigo, revisor e editor de imagens. Você foi muito importante durante todo esse processo. Agradeço pelo seu amor e companheirismo que enchem minha vida de alegria.

Aos meus amados pais, Maria Lúcia (Vera) e Maninho, por serem os grandes responsáveis pela mulher que me tornei. Sempre carinhosos e incentivadores em todas as minhas escolhas, me ensinaram a sempre lutar pelo que almejo sem deixar de lado a humildade e o amor ao próximo. Obrigada por compreenderem minha ausência, sou muito grata a Deus por ter escolhido vocês como meus pais.

À minha irmã Carol (Tiquinha) sempre amorosa, companheira e compreensiva, por me proporcionar muitos momentos alegres e de descontração e por ter me dado presentes maravilhosos: minha dindinha Gabi e Rafinha. Meus sobrinhos não têm noção do quanto foram importantes nos meus momentos de estresse e preocupação com a tese. Uma tarde com eles me revigorava! A convivência com Léo, meu cunhado, também rendeu muitas risadas.

Aos meus sogros Iara e José por estarem sempre dispostos a colaborar com o que eu precisasse e também por, junto com meu cunhado Junior, me proporcionarem momentos de extrema descontração e muitas risadas regadas a um bom vinho.

Aos amigos que junto comigo formaram “Os Sete”: Vívía, Fafá, Dani, Aninha, Marcus e Fábio. Essa amizade que surgiu da nossa união frente a dificuldades, com o passar dos anos só se fortaleceu. Nossos encontros foram revigorantes e cheios de alegria, já quero o próximo.

Aos colegas da Escola Municipal Santa Rita que me acompanharam ao longo desses quatro anos: gestores, professores e funcionários de apoio. Agradeço por me escutarem e compreenderem meu estresse e minhas dificuldades em conciliar as duas atividades em alguns momentos. Sem o auxílio e compreensão de vocês o caminho teria sido muito mais tortuoso.

A todos que de alguma maneira contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meu muito obrigado!

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas
e silenciosas metamorfoses.”

Rubem Alves

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1	23
Indução de calos com potencial embriogênico e organogênese indireta de <i>Comanthera mucugensis</i> Giul. subsp. <i>mucugensis</i>	
Introdução	26
Material e Métodos	28
Resultados	33
Discussão	41
Conclusões	46
CAPÍTULO 2	50
Conservação de <i>Comanthera mucugensis</i> Giul. subsp. <i>mucugensis</i>	
Introdução	53
Material e Métodos	58
Resultados	66
Discussão	76
Conclusões	86

RESUMO

Comanthera mucugensis Giul. subsp. *mucugensis*, possui flor de interesse comercial que devido ao extrativismo excessivo encontra-se ameaçada de extinção. Para suprir a demanda do mercado e evitar o declínio populacional, faz-se necessário desenvolver protocolos para sua multiplicação, podendo a embriogênese somática e a organogênese serem alternativas viáveis. Além disso, é importante investir em estudos de conservação a longo prazo como, por exemplo, a criopreservação. O trabalho teve como objetivos: realizar estudos para tornar a micropropagação mais eficiente e avaliar a conservação de *C. mucugensis* em diferentes temperaturas como estratégia para a conservação do seu germoplasma. Foram testados para a indução da embriogênese somática 2,4-D x BAP e Picloram x BAP e para organogênese indireta BAP e ANA. Na criopreservação foram avaliadas sementes mantidas em nitrogênio líquido (-196°C) por 0, 1, 7, 30, 360 e 540 dias e as plantas inteiras foram submetidas a duas técnicas: vitrificação e encapsulamento-desidratação. Para avaliar o armazenamento, as sementes foram mantidas em temperatura ambiente, 4°C, -20°C, -80°C e -196°C por 30, 90 e 180 dias. Visando observar se a criopreservação das sementes interfere no desenvolvimento, plantas oriundas da germinação in vitro de sementes criopreservadas foram aclimatizadas em areia e terra vegetal (1:1) por 60 dias. O trabalho demonstrou que os reguladores vegetais Picloram e 2,4-D são promissores na indução de calos com potencial embriogênico e que o regulador vegetal ANA (4,9 µM) é eficiente na organogênese indireta. As sementes de *C. mucugensis* podem ser criopreservadas sem comprometer sua qualidade fisiológica, entretanto, não foram eficientes as técnicas para criopreservação de plantas inteiras.

Palavras chaves: Sempre-viva. Embriogênese somática. Organogênese indireta. criopreservação.

ABSTRACT

Comanthera mucugensis Giul. subsp. *mucugensis*, an endemic species of the municipality of Mucugê-BA is threatened with extinction. To reduce extractivism in natural populations, it is necessary to develop efficient multiplication protocols; In this sense somatic embryogenesis and organogenesis may be viable and preservation cryopreservation may be a strategy for its long-term. The objectives of this study were: (1) to analyze the embryogenic competence and the indirect organogenesis of *C. mucugensis*; (2) to evaluate the cryopreservation of seeds and different methods of cryopreservation of *C. mucugensis* plants and (3) to identify the best way to store seeds in the long term. Experiments were performed to induce somatic embryogenesis with different concentrations of 2,4-D X BAP and Picloran X BAP and for indirect organogenesis BAP and ANA were used. Seeds were cryopreserved for 0 (control), 1, 7, 30, 360 and 540 days and other seeds were stored at different temperatures to verify the best form of storage. Plants were cryopreserved with the technique of vitrification and encapsulation-desiccation. Plants from cryopreserved seeds were acclimatized in sand and vegetal soil (1: 1) for 60 days. The work showed that the plant regulators Picloran and 2,4-D are promising in the induction of callus with embryogenic potential and that the plant regulator ANA at 4.9 μM is efficient in indirect organogenesis. The seeds of *C. mucugensis* can be cryopreserved without compromising their physiological quality, but the techniques for cryopreservation of plants have not been efficient.

KEYWORDS: Sempre-viva. Somatic Embryogenesis. Indirect Organogenesis. *In Vitro* Conservation.

INTRODUÇÃO GERAL

A expansão do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil tem ocorrido graças às excelentes condições de clima, água e solos apresentadas pelo país. A horticultura ornamental tem investido em tecnologias que permitem uma produção de qualidade em ambiente protegido visando com isso, atender à demanda do mercado e o elevado nível de exigência do consumidor (OLIVEIRA et al. 2011). Essa expansão tem gerado a necessidade de comercializar variados tipos de plantas, além das tradicionais, sendo as plantas nativas uma alternativa para esse mercado (DEMARCHI, 2001).

A utilização de espécies nativas na ornamentação tem sido uma tendência por unir beleza, resistência às condições climática e manter a identidade do local (Heiden et al. 2006). Além disso, se destaca por adotar plantas que não geram um prejuízo ambiental à paisagem sendo o reconhecimento das características ornamentais o início de estratégias para produção e comercialização da espécie (Heiden et al. 2007a). A comercialização gera demanda para o desenvolvimento de protocolos de propagação (Cardoso, 2013; Beckmann-Cavalcante et al., 2014) e de conservação de plantas ornamentais colaborando de forma efetiva conservação *ex situ* (Stumpf et al. 2009).

Regiões de campo rupestre, como a Chapada Diamantina - Bahia, apresentam espécies nativas com potencial ornamental, principalmente, as pertencentes às famílias Orchidaceae, Cactaceae, Bromeliaceae e Eriocaulaceae; estas são consideradas adequadas para ornamentação por serem visualmente atrativas e tolerarem escassez hídrica (ANDRADE, 2002).

O município de Mucugê, Chapada Diamantina-BA, possui uma área de conservação onde são encontradas plantas com potencial ornamental, dentre

elas, *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, planta símbolo do município (Figura 1). Esta espécie é popularmente conhecida como sempre-viva de Mucugê por conservar a aparência *in natura* das flores por um longo período pós-coleta. Tal característica atraiu o mercado de plantas ornamentais e ocasionou um extrativismo intenso entre as décadas de 60 e 80, quando as flores de *C. mucugensis* abastecia os mercados do Japão e Europa (GIULIETTI et al. 1988). Esta coleta desenfreada levou a espécie à ameaça de extinção, pois, as flores eram coletadas antes da formação e disseminação das sementes, gerando um declínio populacional. Esse fato levou o Instituto Chico Mendes a proibir a coleta dessas flores, entretanto, ela ainda ocorre de forma clandestina e tem contribuído para o risco de extinção dessa espécie (CERQUEIRA et al. 2008; MARTINELLE; MORAES, 2013).



Figura 1: *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*: Flor (A) e Buquê (B).

Segundo Pereira et al. (2007), análises genéticas e morfológicas constataram que as sempre-vivas presentes no Parque Municipal de Mucugê trata-se de uma espécie endêmica, o que corrobora a importância da sua preservação. O estudo comparou populações de *C. mucugensis* provenientes

dos municípios de Rio de Contas, Abaíra e Mucugê e evidenciou a existência de diferenças que justificariam a separação em duas subespécies: (1) *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*, encontrada no município de Mucugê e (2) *C. mucugensis* spp. *riocontensis* A.C.S. Pereira & Giul, encontradas nos municípios de Rio de Contas e Abaíra. Assim, por apresentar uma área de ocorrência mais restrita, a espécie se torna mais suscetível à extinção, o que motiva o desenvolvimento de estratégias para a sua conservação.

Para atender à elevada demanda do mercado, sem pôr em risco a espécie a ser comercializada, é necessário utilizar mecanismos de multiplicação que não dependam da remoção da planta do seu habitat natural (VENTURA, 2007). Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais é um eficiente método para a conservação *ex situ* da diversidade genética (SILVA et al. 2011) por possibilitar a propagação vegetativa em condições assépticas com a utilização de pequenos fragmentos das plantas (LEMA-RUMIŃSKA; KULUS, 2014), permitindo a multiplicação de plantas geneticamente idênticas e sadias a qualquer período do ano, independente das condições climáticas, e em um pequeno espaço (KHATTAB et al. 2014; LEMA-RUMINSKA; KALUS, 2014; PERULLO et al. 2015). Dessa forma, a cultura de tecidos vegetais é uma excelente estratégia para a conservação e produção comercial de espécies ameaçadas com importância econômica (LEMA-RUMIŃSKA; KULUS, 2014; ELIAS et al. 2014), tornando-a pertinente para uso com as sempre-vivas de Mucugê.

Trabalhos anteriores demonstraram que a cultura de tecidos é viável para a produção de brotos de *C. mucugensis* e desenvolveram um protocolo de multiplicação via organogênese direta (LIMA-BRITO et al. 2011). No entanto, o mesmo trabalho ressalta a necessidade do estabelecimento de protocolos para

otimizar a propagação *in vitro* desta espécie. Entre os processos de multiplicação *in vitro*, a embriogênese somática e a organogênese indireta podem favorecer a formação de um número grande de propágulos a partir de um único explante.

A embriogênese somática baseia-se no processo pelo qual uma célula isolada ou de um pequeno grupo de células não-zigóticas, sem conexão vascular com o tecido original, pode gerar um embrião somático quando submetidos a estímulos adequados (JIMÉNEZ, 2001; ARNOLD et al. 2002; QUEIROZ-FIGUEROA et al. 2006). A principal vantagem apresentada pela utilização da embriogênese somática é a alta taxa de multiplicação (ZIMMERMAN, 1993, KLIMASZEWSKA, 2016).

A formação de calos a partir dos explantes é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por embriogênese somática indireta ou organogênese indireta (VENTURIERI; VENTURIERI, 2004). Ambos os processos são complexos e dependem da interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente, além da ação de reguladores vegetais exógenos, em particular auxinas e citocininas, e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais, durante o período de cultivo (ALVES et al. 2004).

Para a definição de um sistema de regeneração por via indireta, seja embriogênese ou organogênese, é necessário o estabelecimento de protocolos específicos, uma vez que as características genéticas de cada espécie determinam respostas diferentes ao cultivo *in vitro* (CARVALHO et al. 2006). Esse processo árduo e laborioso, uma vez que cada espécie apresenta exigências específicas quanto ao protocolo ideal.

A multiplicação de *C. mucugensis* é importante para suprir a demanda do mercado e evitar o seu contínuo extrativismo, principalmente por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção (MARTINELLE; MORAES, 2013). Porém, se faz necessário criar estratégias de conservação a longo prazo, e a criopreservação pode ser uma ferramenta importante nesse processo. A criopreservação consiste em manter sementes ou tecidos vegetais em temperaturas ultrabaixas (-196°C) e tem sido considerada promissora para espécies nativas (DUARTE, 2009; MARCHI et al. 2013; CIVATTI et al., 2014; BÁRBARA et al. 2015). Essa técnica é capaz de interromper o metabolismo celular mantendo a sua integridade genética, pois todos os processos metabólicos, como respiração e atividade enzimática são inativados (CARVALHO; VIDAL, 2003), desta forma, a criopreservação não promove mudanças genéticas significativas (ASHWOOD-SMITH, 1985).

Para se certificar da eficiência das técnicas de cultura in vitro é importante realizar quatro etapas: estabelecimento do meio de cultura, multiplicação, enraizamento dos brotos e aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Esta última etapa consiste na transferência da planta do ambiente in vitro para o ambiente ex vitro, momento em que um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não sobrevivem (HARARIKA, 2003), devido ao sistema radicular não estar totalmente adequado para absorção de água e nutrientes durante a aclimatização e os estômatos ainda não estarem funcionando normalmente (HOFFMANN et al. 2001). Para tentar minimizar o estresse causado às plantas de *C. mucugensis* durante a aclimatização, Lima-Brito et al (2016) fez pré-cultivo em meio MS/2 suplementado com Ácido Idolbutírico – AIB

(4,9 μM) para o aumento da espessura e do número de raízes e manteve as mudas em garrafas plásticas para reter a umidade.

Como o sucesso da técnica depende da sobrevivência das plantas no ambiente *ex vitro* é importante avaliar a taxa de sobrevivência e o vigor das plantas que foram submetidas a criopreservação.

A criopreservação apresenta vantagens por requerer um espaço pequeno para a instalação de um banco de germoplasma e por manter a integridade genética (ALMEIDA et al., 2002; ENGELMANN, 2011). Conservar sementes é a forma mais eficiente e comum de conservação *ex situ*, por garantir a variabilidade genética (LI; PRITCHARD, 2009; GOLDFARB et al., 2010; PENCE, 2010). Esta técnica vem sendo utilizada em bancos de germoplasma, em espécies de propagação vegetativa e com sementes de plantas ameaçadas de extinção (ENGELMANN, 2011).

Para a criopreservação de plantas é necessária a utilização de soluções que promovam a sua desidratação antes do congelamento, pois, dessa forma, evita-se a cristalização do material intracelular e posterior rompimento das membranas celulares durante o processo de descongelamento (SANTOS, 2000). Dentre as técnicas utilizadas temos o congelamento lento, a vitrificação e o encapsulamento-desidratação (ENGELMANN 2004).

A vitrificação é um processo onde há uma mudança física, os líquidos ficam altamente viscosos e, por conta disso, apresentam propriedades mecânicas de um sólido sem a formação de uma estrutura cristalina (SANTOS, 2000). Para que ocorra a vitrificação, o material a ser congelado deverá ser exposto previamente a soluções crioprotetoras (ENGELMANN, 2010), de forma a garantir uma maior desidratação dos explantes. Além disso, o congelamento e

o reaquecimento devem ser rápidos para garantir o sucesso do procedimento (SAKAI; ENGELMANN 2007; SAKAI et al. 2008). Dentre as soluções crioprotetoras mais comuns estão dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol e metanol (SANTOS, 2000; BENSON, 2008).

A técnica de encapsulamento-desidratação consiste na imersão do explante em solução de alginato de sódio, sendo esse material aspirado e gotejado em uma solução de cloreto de cálcio para complexação (SANTOS, 2000). Antes do congelamento os explantes são pré-cultivado em solução saturada de sacarose e desidratada em fluxo laminar (SANTOS, 2000; ENGELMANN, 2004).

A criopreservação é eficiente para a conservação, entretanto, é importante investigar outras formas de congelamento e/ou armazenamento que possam apresentar eficiência similar e que sejam mais acessíveis. Alguns equipamentos comuns em universidades e centros de pesquisa como ultrafreezer (-80° C) e o freezer de geladeira (-20°C) podem ser testados como locais de armazenamento. É importante ressaltar que para todos esses estudos se faz necessário também a avaliação das sementes em temperatura ambiente para verificar o quão eficiente é o protocolo desenvolvido.

Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a indução à embriogênese somática, organogênese indireta e criopreservação de explantes de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* como estratégias auxiliares à conservação do germoplasma de sempre-vivas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. D. A. C. et al. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, p. 295-302, 2002.
- ALVES, E. C. S. C. et al. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. EMBRAPA. Planaltina: EMBRAPA Cerrado. **Documentos**. 58, 2002.
- ARNOLD, S. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Genetic Damage Is Not Produced by Normal Cryopreservation Procedures Involving either Glycerol or Dimethyl Sulfoxide: A Cautionary Note, However, on Possible Effects of Dimethyl Sulfoxide. **Cryobiology**, v. 22, p. 427-433, 1985.
- BÁRBARA, E. P. S. et al. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia - Edição Especial Cactaceae**, v. 9, n. 2, p. 91-96, 2015.
- BECKMANN-CAVALCANTE, et al. Potencial ornamental de espécies do Bioma Caatinga. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 43-58, 2017.
- BECKMANN-CAVALCANTE M. Z., et al. Propagação de *Alternanthera dentata* pelo processo de estaquia. **Comunicata Scientiae**, v. 5, p. 170-177. 2014.
- BENSON, E. E. Cryopreservation of Phytodiversity: A Critical Appraisal of Theory & Practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, p.141–219, 2008.
- CARDOSO, J.C. Melhoramento de espécies ornamentais como estratégia para o desenvolvimento e autossuficiência do setor. **Horticultura Brasileira**. v. 31, p. 1-1. 2013.
- CARVALHO, J. et al. Embriogênese Somática. EMBRAPA. Campina Grande: EMBRAPA Algodão. **Documentos**, 152, 2006.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Crioconservação no melhoramento vegetal. EMBRAPA. Campina Grande: EMBRAPA Algodão. **Documentos**. 115, 2003.
- CERQUEIRA, C. O.; FUNCH, L. S.; BORBA, E. L. Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 962-969, 2008.

CIVATTI, L. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 38, p. 3847-3859, 2014.

DEMARCHI, C. Guerra das flores movimentou os trópicos. **Gazeta Mercantil Latino-Americana**, p. 7-8, 2001.

ELIAS, H. et al. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens* in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 120, p.729-739, 2014.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 40, n. 4, p. 427, 2004.

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

GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 1, p. 179-193, 1988.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Cryogenic storage of seeds of physic nut (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas** v. 23, n. 1, p. 27-33, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, p.402-38. 1998.

HEIDEN, G., et al. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.12, p.1-7, 2006.

HEIDEN G., et al. Uso de plantas subarborescentes e herbáceas nativas do Rio Grande do Sul como alternativa a ornamentais exóticas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, p. 850-853. 2007.

HARARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HOFFMANN, A. et al . Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. **Ciência e Agrotecnologia** , v. 25, n. 2, p. 462- 467, 2001

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. . **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** , v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

KHATTAB, S. et al. Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS– PAGE and HPLC. **Gene**, v.533, n.1, p.313–321, 2014.

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

tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 2006 p.519-532.

KLIMASZEWSKA, K. et al. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germana, M.A., Lambardi, M. (eds) *In vitro embryogenesis in Higher Plants*, p. 131-166, 2016.

LEMA-RUMIŃSKA, J.E KULUS, D. Micropropagation of Cacti - a Review. **Haseltonia**. n.19, 46–63, 2014.

LI, D.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant science**, v. 14, n. 11, p. 614–621, 2009.

LIMA-BRITO, A. et al. In vitro morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul: subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 502-510, 2011.

MARCHI, M. N. G. et al. Seed cryopreservation of the native cacti *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* from Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 21, p. 3250-3254, 2013.

MARTINELLE, G.; MORAES M. A. Livro vermelho da flora do Brasil. **Centro nacional de conservação da flora**. p.498. 2013.

OLIVEIRA, J., M. S. R. et al. Estratégia de competitividade do mercado de flores e plantas ornamentais: um estudo multifocal. **Conexão Ciência**, v. 6, p. 144-164, 2011.

PENCE, V. C. The possibilities and challenges of in vitro methods for plant conservation. **Kew Bulletin**, v. 65, p. 539-547, 2010.

PEREIRA, A. C. S. et al. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, p. 401-416, 2007.

PERULLO, N., et al. Seed cryopreservation and micropropagation of the critically endangered species swamp pink (*Helonias bullata* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v.51, n. 3, p. 284-293, 2015.

QUEIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.

SAKAI A.; ENGELMANN F. Vitrification, encapsulation–vitrification and droplet–vitrification: a review. **CryoLetters** v. 28, p. 151–172; 2007.

SAKAI A. et al. Development of pvs-based vitrification and encapsulation–vitrification protocols. In: Reed B. M. (ed) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, Berlin, pp 33–58; 2008.

SILVA, S. R. et al. Plano Nacional para Conservação das Cactáceas. Série Espécies Ameaçadas nº 24. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Diversidade, ICMBIO. 111p. 2011

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

STUMPF, E.R.T. et al. Características ornamentais de plantas do Bioma Pampa. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 15, p. 49-62, 2009.

VENTURA, G. M. Cultivo in vitro de Orquídeas do Grupo Cattleya, em Diferentes Meios de Cultura e Irradiâncias. 2007. 110p. Universidade Federal de Viçosa. Tese de doutorado. 2007.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazonica**, v. 34, p. 507-511, 2004.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO I

Indução de calos com potencial embriogênico e organogênese indireta de

Comanthera mucugensis Giul. subsp. *mucugensis*

RESUMO

Comanthera mucugensis Giul. subsp. *mucugensis* apresenta flores atrativas ao mercado ornamental, o que tem causado um intenso extrativismo e conseqüente declínio populacional. Diante deste cenário, faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas viáveis para a sua multiplicação. Neste sentido, o trabalho teve como objetivo avaliar a indução de calos com potencial embriogênico e da organogênese indireta de *C. mucugensis* em função de diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais. Os experimentos para induzir calos embriogênicos testaram o 2,4 D (0, 9 e 18 μ M) X BAP (0, 8, 16, 32 e 64 μ M), Picloran (0, 50, 100 e 200 μ M) X BAP (0, 50, 100 e 200 μ M) e os reguladores BAP (4,4 μ M) e ANA (0, 4,9 e 9,8 μ M) foram testados para indução organogênese indireta em dois tipos de explantes: folha e caule. A quantidade de calos embriogênicos foi proporcional ao aumento da concentração de 2,4 D, sendo que o melhor resultado foi obtido com 18 μ M. No experimento combinando Picloran e BAP, o tratamento suplementado com 200 μ M de Picloran gerou a maior quantidade de calos com potencial embriogênico (24%). A análise histológica de calos obtidos evidenciou centros meristemáticos organizados com núcleos evidenciando o potencial embriogênico dos mesmos. Em relação à organogênese indireta, o melhor explante foi o caule, visto que as folhas não foram responsivas. Para *C. mucugensis*, os reguladores vegetais 2,4-D e Picloran são promissores na indução de calos com potencial embriogênico e o meio sem adição de reguladores vegetais é eficiente na organogênese indireta.

Palavras chave: Eriocaulaceae. Calogenese. Regeneração *in vitro*.

ABSTRACT

Comanthera mucugensis subsp. *mucugensis* have attractive flowers for the ornamental market, which led to an intense extractivism and population decline, generating the need for viable alternatives for their multiplication. In this sense, the objective of this work was to evaluate the induction of somatic embryogenesis and the indirect organogenesis of *C. mucugensis* as a function of different types and concentrations of plant regulators. Experiments to induce callus embryogenesis tested the 2,4- D (0; 9 and 18 μM) X BAP (0; 8; 16; 32 and 64 μM) and Picloran (0; 50; 100 and 200 μM) BAP (0; 50; 100 and 200 μM) and the BAP (4.4 μM) and ANA (0; 4.9 and 9.8 μM) regulators were tested for indirect organogenesis. The number of the callus was proportional to the increase of the 2,4-D concentration, and the best result was obtained with 18 μM . The treatment with Picloran the best was supplemented with 200 μM generated more callus (24%). The histological analysis of callus obtained in experiments 1 and 2 showed organized meristematic centers and with nuclei evidencing the embryogenic potential of the studied callus. In relation to indirect organogenesis, the best explant was the stem, since the leaves were not responsive. For *C. mucugensis*, plant regulators Picloran and 2,4-D are promising in the induction of callus with embryogenic potential and that medium without addition of plant regulators is efficient in indirect organogenesis.

KEYWORDS: Eriocaulaceae. Calogenesis. Plant Regeneration.

INTRODUÇÃO

O mercado de flores ornamentais tem crescido no Brasil nos últimos anos, o que levou ao investimento em tecnologias que permitiram a produção de plantas de qualidade em larga escala (OLIVEIRA et al. 2011). Devido a essa expansão, plantas nativas têm sido introduzidas no mercado ornamental, principalmente as que toleram escassez hídrica, como representantes das famílias Orchidaceae, Cactaceae, Bromeliaceae e Eriocaulaceae (ANDRADE, 2002).

Comantera mucugensis Giul. subsp. *mucugensis* é uma Eriocaulaceae endêmica do município de Mucugê, Chapada Diamantina-BA (PEREIRA et al. 2007), popularmente conhecida como sempre-viva de Mucugê. Esta espécie possui potencial ornamental por conservar a aparência *in natura* das flores por um longo período pós-coleta. Esta característica ocasionou um extrativismo intenso das flores dessa espécie (GIULIETTI et al. 1988), o que levou a uma redução significativa da população natural e atualmente a mesma encontra-se ameaçada de extinção (MARTINELLE; MORAES, 2013). Para suprir a demanda do mercado, de forma sustentável, faz-se necessário utilizar mecanismos de multiplicação de plantas realmente efetivos (VENTURA, 2007), sendo a cultura de tecidos uma alternativa viável.

A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos que apresenta diversas vantagens, como a produção de brotos em condições assépticas, em tempo reduzido, sob condições controladas e sem a influência das variações climáticas (KHATTAB et al. 2014; PERULLO et al. 2015). Além disso, a alta taxa

de multiplicação acelera os programas de propagação clonal, fato que possibilita a propagação vegetativa de genótipos de alto valor comercial (TEIXEIRA, 2001).

A embriogênese somática e a organogênese são vias de regeneração da micropropagação que tem como principal vantagem a multiplicação de plantas em grandes proporções (ZIMMERMAN, 1993). Tanto a organogênese quanto embriogênese somática podem ocorrer diretamente do explante ou através da fase intermediária de calo. Esta última tem sido utilizada com sucesso para algumas espécies nativas como *Jatropha curcas* (FEITOSA et al. 2013), *Ugni molinae* (BERAUD et al. 2014), *Ananas comosus* (PINEDA et al. 2014), *Caralluma puciflora* (KIRANMAI et al. 2015), *Solanum melongena* (ZAYOVA et al. 2012), *Eureka lemon* (GHOLAMI et al. 2013) e *Vitis vinifera* (MAILLOT et al. 2006).

Para *C. mucugensis* ou *Syngonanthus mucugensis* (nome da espécie antes do trabalho de reorganização do táxon de Echternacht et al 2014) não há registro na literatura de protocolos para a obtenção de calos embriogênicos e organogênese indireta. Entretanto, ao analisar a regeneração *in vitro* em *C. mucugensis*, Lima-Brito et al. (2011) observaram brotos que se desenvolveram via organogênese indireta, este dado evidencia que o investimento em protocolos de regeneração *in vitro* a partir de calos é promissor.

Para se obter um protocolo eficiente, tanto para a embriogênese somática, quanto para organogênese por via indireta, são necessárias adaptações para cada espécie. Isto ocorre porque na cultura de tecidos há uma dependência do genótipo das plantas utilizadas e são necessários adequação de cultivo para otimizar as condições ambientais da cultura, o meio nutritivo e tipo, concentração e explante. (ESTRADA-LUNA et al. 2008). Os reguladores vegetais auxinas e

citocininas são importantes para a regulação do crescimento e morfogênese (GEORGE et al. 2008) e têm sido utilizados com sucesso na propagação *in vitro* de diversas espécies.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a indução de calos embriogênicos e a organogênese indireta de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* em função de diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Estabelecimento *in vitro*

As sementes de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* foram coletadas no Projeto Sempre Viva, localizado no município de Mucugê, BA (12°59'83"S e 42°20'91"W). Estas foram desinfestadas com imersão em álcool a 70% por um minuto e em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo por quinze minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas quatro vezes com água estéril e inoculadas em meio de cultivo Murashige & Skoog (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas (MS/2). O meio nutritivo foi suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar, teve o pH aferido entre 5,6 - 5,8 e foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. Na sequência foram distribuídos 150 mL do meio nutritivo em potes plásticos de 500 mL. As plantas foram mantidas em sala de crescimento no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia (LCTV-UFBA) com temperatura 25±3 °C, luz branca fluorescente a 60 µmol m⁻²

$2s^{-1}$ e fotoperíodo de 16h. Seis meses após a germinação, as plantas apresentavam cerca de 2cm de parte aérea possibilitando sua utilização como fonte de explante.

2. Ação de reguladores vegetais na indução de calos em *C. mucugensis* subsp. *mucugensis*

2. 1 Efeito de 2,4-D e BAP na formação de calos

Para a indução de calos, foram utilizados como explante cortes transversais do caule oriundos de plantas previamente estabelecidas *in vitro* com cerca de 1-2 mm de espessura e de cada planta eram obtidos no máximo 3 cortes como explante. Cinco explantes foram inoculados em cada placa de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 45 ml de meio de cultura MS com diferentes concentrações de 2,4-diclorofenoxiacético - 2,4-D (0, 9 e 18 μM), e de 6-benzilaminopurina – BAP (0, 8, 16, 32 e 64 μM) isolados e combinados entre si. Os meios nutritivos foram suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificados com 7 g L^{-1} de ágar, pH ajustado para 5,6-5,8 e autoclavados a 121 °C por 15 minutos e, posteriormente, distribuídos em placas de Petri em fluxo laminar. Após a inoculação as placas de Petri foram envoltas em papel alumínio para manter o material preservado da luz. As unidades experimentais foram mantidas por 90 dias em sala de crescimento a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 5 (concentrações de 2,4D x concentrações de BAP) com três repetições de cinco amostras cada (5 explantes por placa) por tratamento. O material foi avaliado a cada 15 dias por 60 dias.

2.2 Efeito do BAP e do Picloram na formação de calos

Segmentos transversais do caule com aproximadamente 1-2 mm de espessura oriundas de plantas estabelecidas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e acrescido de diferentes concentrações de BAP (0, 50, 100 e 200 µM), e Picloram (0, 50, 100 e 200 µM) isolados ou combinados entre si. O meio nutritivo teve o pH ajustado entre 5,6-5,8, foi solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e autoclavado por 15 minutos a 121°C. Os explantes foram inoculados em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 45 mL de meio nutritivo. O material foi envolto em papel alumínio e em seguida colocado em câmara de germinação a 25 ± 3° C por 90 dias. Após esse período foram realizadas três avaliações periódicas a cada mês. O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 4 (BAP x Picloran) com seis repetições de cinco amostras por tratamento.

2.3 Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na maturação de calos com potencial embriogênico

Os calos obtidos através do tratamento com 18 µM de 2,4-D e 64 µM de BAP tiveram as estruturas esféricas separadas do explante que os originou e selecionados para indução da maturação. Para tanto, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS/2 suplementado com BAP em diferentes concentrações (0,0; 13,32; 26,64; 39,96 µM). Posteriormente, foram mantidos em câmara de germinação a 25 ± 3°C sob luz branca fluorescente (60 µmol m⁻² s⁻¹) e fotoperíodo de 16h por 30 dias. Foi utilizado um delineamento

inteiramente casualizado com 3 repetições de 10 amostras por tratamento. O material foi avaliado por 30 dias a cada 15 dias para observar se há desenvolvimento de brotos.

3. Efeito de diferentes concentrações de ANA na indução da organogênese indireta

Foram realizados dois experimentos, sendo utilizado o explante folha em um experimento e no outro o explante foi cortes transversais do caule de aproximadamente 1-2 mm de espessura, de plantas de 1,5 cm de parte aérea, derivadas da germinação *in vitro*. Após a secção, os mesmos foram inoculados em meio de cultura MS/2 suplementado com 2 g L⁻¹ de carvão ativo, 15 g L⁻¹ de sacarose, BAP (4,4 µM) conforme Lima-Brito et. al. (ANO) e diferentes concentrações de ANA (0, 4,9 e 9,8 µM). O meio nutritivo teve o pH ajustado entre 5,6-5,8, foi solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar e foi autoclavado por 15 minutos a 121°C. Os explantes foram inoculados em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 45 mL de meio nutritivo. As unidades experimentais foram mantidas em câmara de germinação a 25 ± 3° C sob luz branca fluorescente (60 µmol m⁻² s⁻¹) e fotoperíodo de 16h por 60 dias. O delineamento foi inteiramente casualizado com seis repetições de cinco explantes por tratamento.

4. Variáveis analisadas e análise estatística

Decorrido o tempo estabelecido para cada experimento as variáveis analisadas nos experimentos para indução de calos foram: sobrevivência do

explante (%S), oxidação (%O), calogênese (%C), textura e cor do calo. No experimento de organogênese indireta foram analisadas sobrevivência (%S), oxidação (%O), calogênese (%C), brotação (%B) e número de brotos por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2011).

5. Análise histológica

Os calos induzidos nos experimentos para indução de calos foram selecionados para a análise anatômica. No Laboratório de Anatomia Vegetal e Identificação de Madeiras (LAVIM) da UFBA, as amostras foram fixadas em FAA₇₀ (formaldeído, ácido acético e etanol 70%, 1:1:18, v/v) (JOHANSEN, 1940) por no mínimo 24 horas. Após a fixação, as amostras passaram por um processo de desidratação em série etílica crescente (álcool 70, 80, 90 e 100%) por uma hora na primeira concentração e duas horas nas seguintes; pré-infiltração em álcool 100% e resina pura (1:1) por duas horas e posterior infiltração em resina ativada por no mínimo 24 horas em ambiente refrigerado. Para obtenção dos cortes histológicos, as amostras foram emblocadas em resina histológica sintética (Leica historesin). Para isso, foram utilizados histomoldes de polietileno 6x9 mm contendo resina de inclusão (resina ativada + endurecedor) e, imediatamente levadas à estufa a 50 °C para endurecimento. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo (Thermo scientific – HM 325) em secções transversais de 5 µm de espessura. Os cortes obtidos foram organizados em lâminas e corados com azul de toluidina 0,05% (O'BRIEN et al. 1965) por 5

minutos e lavadas em água de torneira. Depois de coradas as lâminas foram montadas em meio permanente com resina sintética Entellan®. A visualização ocorreu em microscópio óptico Axio Scope A1 e registrado com câmera digital Cannon acoplada utilizando software AxioVision Release versão 4.8.2.

RESULTADOS

1. Ação de reguladores vegetais na indução de calos em *C. mucugensis* Giul. *subsp. mucugensis*

1. 1 **Efeito de 2,4D e BAP na formação de calos**

Não houve diferença significativa para a interação entre a porcentagem de sobrevivência dos explantes tendo essa taxa variado nos tratamentos de 100% a 93,33% (Tabela 01). A oxidação foi elevada em todos os tratamentos, mas não foi verificada diferença estatística entre os tratamentos, tendo suas médias oscilado entre 39,99 e 93,33%.

Houve uma interação significativa ($p=0,05$) entre os fatores BAP e 2,4-D para a variável calogênese. Foi observado um aumento na porcentagem de calos à medida que se elevou a concentração de 2,4-D em meio nutritivo isento de BAP, sendo que o tratamento com 18 μM de 2,4D diferiu estatisticamente do controle. Neste caso, o percentual de indução de calos variou de 26,67% no tratamento controle para 66,66% no meio nutritivo suplementado com a maior concentração deste regulador (Tabela 1). Quando se analisou a ação combinada do 2,4-D e do BAP o tratamento que apresentou maior calogênese (33%) foi o meio nutritivo suplementado com 9 μM de 2,4-D e 32 μM de BAP, entretanto, de

modo geral, a associação entre a auxina e citocinina testada reduziu significativamente a calogênese (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de sobrevivência, oxidação e calogênese em plantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* em função da combinação de diferentes concentrações de 2,4D e BAP.

2,4D (μM)	BAP (μM)					Média
	0	8	16	32	64	
Sobrevivência						
0	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	93,33 ^{Aa}	98,66 ^a
9	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^a
18	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^a
Média	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A	97,77 ^A	100,00 ^{Aa}
Oxidação						
0	39,99 ^{Aa}	83,33 ^{Aa}	86,66 ^{Aa}	49,99 ^{Aa}	63,33 ^{Aa}	64,66 ^a
9	59,99 ^{Aa}	73,33 ^{Aa}	93,33 ^{Aa}	93,33 ^{Aa}	83,33 ^{Aa}	81,10 ^a
18	66,66 ^{Aa}	93,33 ^{Aa}	66,66 ^{Aa}	66,66 ^{Aa}	66,66 ^{Aa}	71,99 ^a
Média	55,55 ^A	83,33 ^A	82,21 ^A	69,99 ^A	76,66 ^A	
Calogênese						
0	26,67 ^{Ba}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	6,66 ^{Ba}	6,66 ^{Aa}	8,00 ^a
9	46,66 ^{ABa}	0,00 ^{Ac}	0,00 ^{Ac}	33,33 ^{Aab}	6,66 ^{Abc}	15,55 ^a
18	66,66 ^{Aa}	0,00 ^{Ab}	6,66 ^{Ab}	0,00 ^{Bb}	6,66 ^{Ab}	17,33 ^a
Média	46,66 ^A	0,00 ^B	2,22 ^B	13,33 ^B	6,66 ^B	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Morfologicamente, os calos apresentaram textura friável e uma coloração opaca, levemente amarronzada, e constituído por estruturas globulares (esféricas) que se desprendiam facilmente do explante que os originou (Figura 1A). Alguns explantes não responderam aos tratamentos e oxidaram, apresentando uma coloração marrom escura (Figura 1B).

A análise histológica dos calos, evidenciou a presença de centros meristemáticos organizados, constituídos por células isodiamétricas com

formato alongado, indiferenciadas, pequenas e com núcleo e nucléolos evidentes (Figura 1C-D).

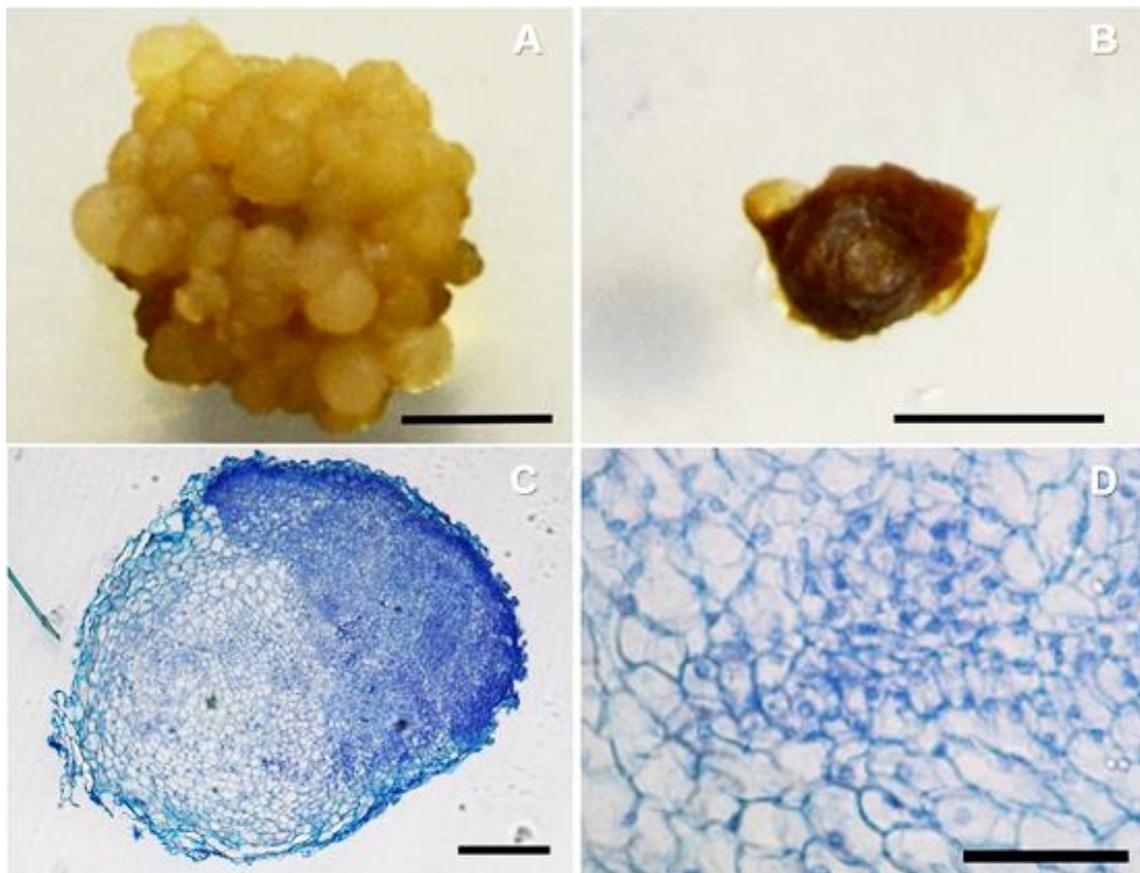


Figura 1: Morfogênese e anatomia de calos de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* cultivado no escuro em meio MS suplementado com 18 μ M de 2,4D. Crescimento de calos em formato globular (A) e explante oxidado (B). Panorama geral do corte transversal de um segmento isolado de um calo com formato globular (C) e células do centro meristemático (D). Barras: A, B: 5 mm; C: 500 μ m e D: 100 μ m.

1.2 Efeito do BAP e do Picloran na formação de calos

A sobrevivência dos explantes foi alta em todos os tratamentos e não diferiu estatisticamente para a interação entre BAP e Picloran, variando entre 60 e 100% (Tabela 2). Houve 100% de oxidação dos explantes, sendo que a intensidade da mesma variou entre marrom claro e marrom escuro. Os explantes que apresentaram coloração marrom escuro não responderam aos estímulos dos reguladores vegetais e foram consideradas mortas (Tabela 2).

O melhor resultado da interação entre BAP e Picloran para indução de calogênese foi o tratamento suplementado com 200µM de Picloran (24%). Diferente dos demais, o tratamento com 100µM de Picloran, isolado ou combinado com BAP, não foi responsivo em nenhuma das concentrações testadas para a calogênese (Tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de sobrevivência, oxidação e calogênese em plantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* em função de da combinação de diferentes concentrações de BAP e Picloran.

BAP(µM)	Picloran (µM)				Média
	0	50	100	200	
Sobrevivência					
0	75,80 ^{ABa}	60,00 ^{Aa}	84,00 ^{Aba}	100,00 ^{Aa}	78,11 ^a
50	84,00 ^{Aa}	80,00 ^{Aa}	76,00 ^{Aa}	68,00 ^{Aa}	77,00 ^a
100	88,00 ^{Aa}	84,00 ^{Aa}	88,00 ^{Aa}	80,00 ^{Aa}	85,00 ^a
200	100,00 ^{Aa}	80,00 ^{Aa}	84,00 ^{Aa}	76,00 ^{Aa}	85,00 ^a
Média	82,00 ^A	76,00 ^A	83,00 ^A	81,00 ^A	
Oxidação					
0	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^a
50	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^a
100	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^a
200	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	100,00 ^a
Média	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A	100,00 ^A	
Calogênese					
0	2,86 ^{Ab}	4,00 ^{Ab}	0,00 ^{Ab}	24,00 ^{Aa}	5,55 ^a
50	8,00 ^{Aa}	12,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Ba}	5,00 ^a
100	0,00 ^{Aa}	4,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Ba}	2,00 ^a
200	8,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Aa}	0,00 ^{Ba}	1,00 ^a
Média	3,89 ^A	5,00 ^A	0,00 ^A	6,00 ^A	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os calos apresentaram formas variadas e em sua maioria com textura compacta (Figura 2 A-D). Houve variação na coloração dos calos do experimento

com 2,4-D combinado com BAP, apresentando diferentes tonalidades de marrom e um padrão globular observado nos tratamentos com 200 μ M de BAP (Figura 2A) e 200 μ M de Picloran (Figura 2D). Além disso, uma amostra dos calos originados no tratamento com 200 μ M de Picloran apresentou uma estrutura alongada com regiões clorofiladas emitidas a partir de um calo que se assemelha ao desenvolvimento de um broto (Figura 2 E-F).

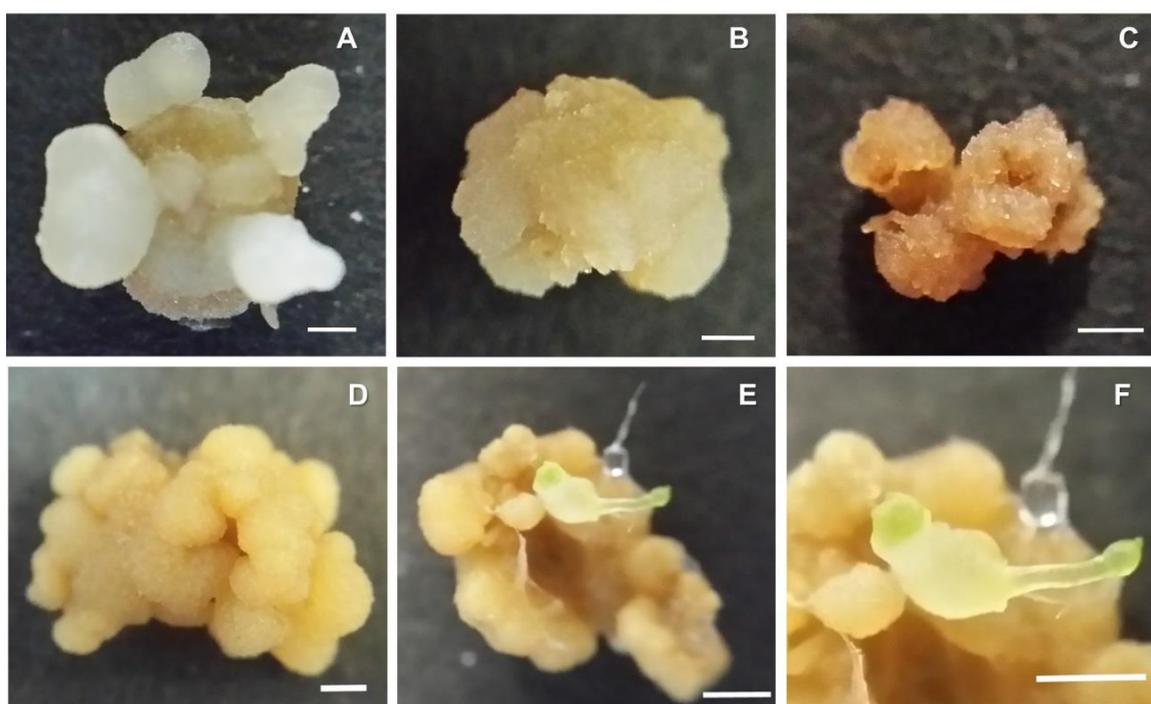


Figura 2: Morfologia dos diferentes tipos de calos encontrados *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* cultivados em meio MS suplementado com 200 μ M de BAP (A), 50 μ M de BAP e 100 μ M de Picloram (B), 50 μ M de BAP e 50 μ M de Picloram (C) e 200 μ M de Picloram (D-F). Calos com diferentes padrões morfológicos e em escalas de tons de marrom (A-D). Estrutura morfológica clorofilada desenvolvida a partir de calos (E-F). Barras: 1 mm

A análise histológica evidenciou uma estrutura globular sem conexão vascular com o explante que o originou (Figura 3) no tratamento com 200 μ M de Picloram. É possível visualizar células meristemáticas no centro do calo, com núcleo evidente.

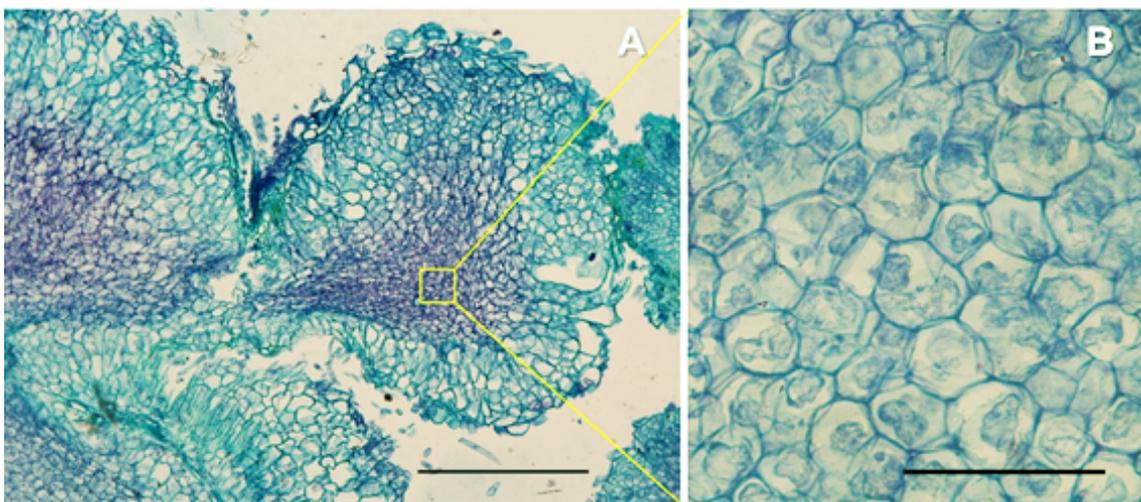


Figura 3: Análise histológica de calos de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* obtidos de explantes cultivados no escuro em meio MS suplementado com 200 μ M de Picloram. Aspecto geral do corte transversal do explante com calos (A) e detalhe das células do calo (B). Barra: A - 500 μ m; B - 100 μ m.

1.3 Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na maturação de calos com potencial embriogênico

Os calos com formatos globulares, obtidos nos tratamentos com 18 μ M de 2,4-D e 64 μ M de BAP, que foram transferidos para meios contendo diferentes concentrações de BAP não responderam ao estímulo do regulador vegetal. Portanto, não houveram modificações morfológicas nas estruturas globulares e nem a maturação de possíveis embriões somáticos.

2. Efeito de diferentes concentrações de ANA na indução da organogênese indireta

No experimento utilizando o explante folha, apenas os exemplares inoculados em meio nutritivo livre de reguladores vegetais emitiram brotos (Tabela 3). A via de regeneração foi a organogênese direta e poucos explantes emitiram mais de um broto, apresentando uma média de 0,53 brotos por

explante. Houve emissão de brotos pela folha mesmo quando esta apresentava-se oxidada (Figura 4A).

Tabela 3: Efeito de diferentes concentrações de ANA sobre a sobrevivência (%), brotação (%), número de brotos por explante e calogênese (%) no explante folha de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*.

ANA (μM)	Sobrevivência (%)	Brotação (%)	Brotos/explante	Calogênese (%)
0,0	26,66 ^a	11,00 ^a	0,53 ^a	0,00 ^a
4,9	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a
9,8	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

O aumento nas concentrações de ANA reduziu significativamente a sobrevivência do explante caule (Tabela 4). O maior percentual de sobrevivência ocorreu no tratamento controle (71,67%) e, o meio de cultivo suplementado com a maior concentração de ANA promoveu o menor percentual para esta variável (23,33%). O tratamento com concentração intermediária não diferiu significativamente dos demais. Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de ANA para a calogênese.

Tabela 4: Efeito de diferentes concentrações de ANA sobre a, sobrevivência (%), brotação(%), número de brotos por explante e calogênese (%) no explante caule *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*.

ANA (μM)	Sobrevivência (%)	Brotação (%)	Brotos/explante	Calogênese (%)
0,0	71,67 ^a	60,00 ^a	4,72 ^a	26,66 ^a
4,9	50,00 ^{ab}	50,00 ^a	4,54 ^a	36,66 ^a
9,8	23,33 ^b	60,00 ^a	0,63 ^a	13,33 ^a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Quando analisada a variável brotação é possível observar que não houve diferença estatística entre as concentrações de ANA, tendo sua porcentagem variado entre 50 e 60%. Os números de brotos por explante oscilaram entre 0,63 e 4,72 e também não apresentou diferença significativa entre as diferentes concentrações de ANA e o controle.

Foi observada organogênese direta no explante submetido ao tratamento controle para folha (Figura 4A) e com 9,8 μM de ANA para o explante caule (Figura 4B).

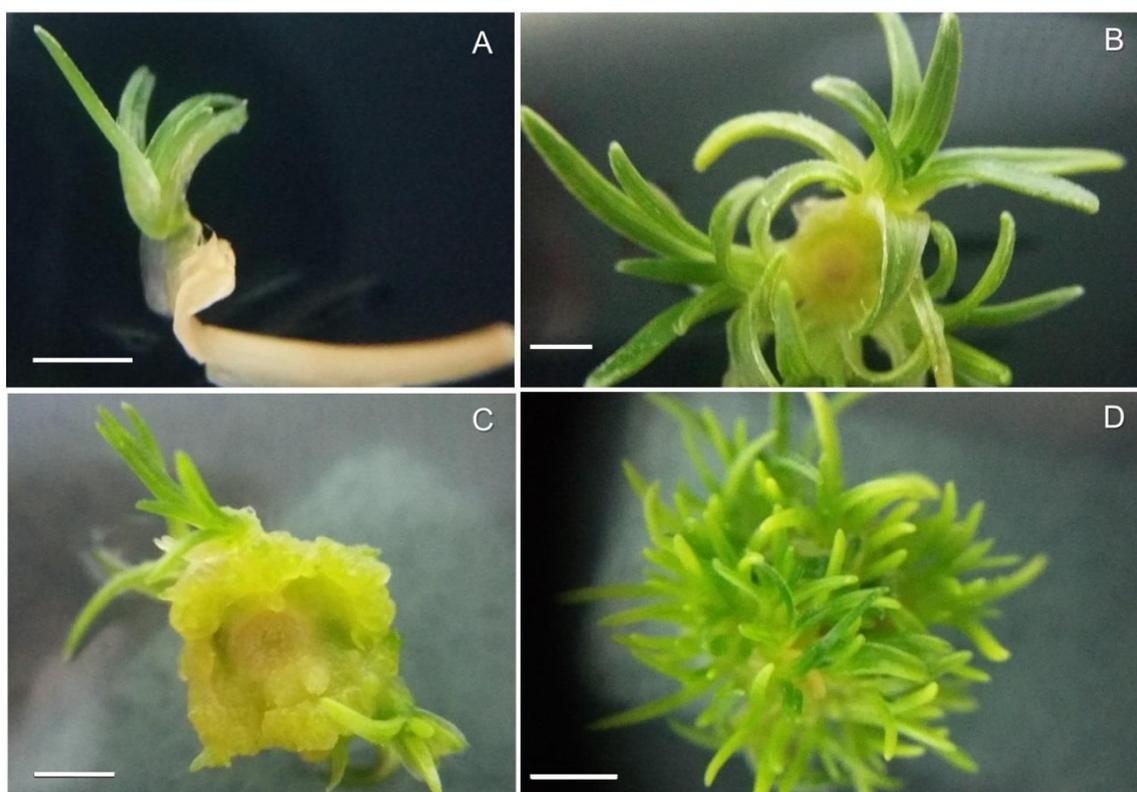


Figura 4: Organogênese direta e indireta de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. Formação de brotação de forma direta a partir de folha (A) e caule (B); Formação de caule no explante caule e início de diferenciação de brotações após 30 dias de cultivo (C) e múltiplas das brotações após 45 dias de cultivo (D) com 4,9 μM de ANA. Barra: 1mm.

Passados 30 dias de cultivo *in vitro* os explantes caule apresentaram calogênese (Figura 4C). Os calos continuaram sendo avaliados quinzenalmente

e com 45 dias de cultivo, houve a diferenciação de brotos derivados dos calos (figura 4D), o que evidencia a ocorrência de organogênese indireta a partir do explante folha com 4,9 μ M de ANA.

DISCUSSÃO

A obtenção de explantes para a multiplicação *in vitro* a partir da germinação apresenta algumas vantagens como: a variabilidade genética, a redução de agentes contaminantes e a juvenildade dos explantes, que podem otimizar a regeneração *in vitro* (GOLLE et al. 2014; DIDONÉ et al. 2015). No caso de espécies nativas ameaçadas de extinção, esse método, além das vantagens supracitadas, evita a remoção de exemplares do seu habitat e reduzem os danos físicos à planta-mãe, caso haja retirada de partes da planta (LEMA-RUMIŃSKA; KULUS, 2014). No caso de *C. mucugensis*, após o estabelecimento *in vitro* via sementes, podem ser utilizados como explantes as folhas e o caule, entretanto, o caule apresentou melhor resposta para a organogênese indireta tanto neste trabalho quanto em trabalhos anteriores (PAIXÃO-SANTOS et al. 2008; LIMA-BRITO et al. 2011). Segundo Lima et al. (2012) isto pode ser atribuído à maior presença de tecidos meristemáticos no caule, quando comparados às folhas.

A obtenção de brotos a partir de calos pode aumentar a variabilidade genética devido a possibilidade de variação somaclonal decorrente do desordenado crescimento dos tecidos no processo de calogênese. Dessa forma, tanto a embriogênese somática como a organogênese indireta seriam interessantes para a *C. mucugensis*, pois as populações dessa espécie possuem

baixa variabilidade genotípica devido a elevada endogamia (LIMA-BRITO et al. 2011) .

No presente trabalho o uso de reguladores vegetais no meio nutritivo possibilitou a formação de calos nos três experimentos. Os reguladores vegetais mais utilizados na obtenção de calos são as auxinas e as citocininas. Apesar do conhecimento sobre a importância desses reguladores para a indução e desenvolvimento de calos, não há um consenso sobre o tipo de regulador vegetal e a concentração ideal para que isso ocorra.

O primeiro experimento, evidenciou uma interação significativa (Tabela 1) para a produção de calos, e a auxina 2,4 D e a citocinina BAP. Alguns trabalhos com *C. mucugensis* induziram calos na presença de BAP. Paixão-Santos et al. (2008), que utilizando BAP nas concentrações 1,78 e 3,55 μM encontraram as maiores porcentagens de calo 71,25 % e 68,75 %, respectivamente, no entanto, os autores não observaram a regeneração de brotos a partir dos calos. Já Albuquerque (2013) observou a organogênese indireta no explante folha, com uma concentração de 0,88 μM de BAP.

Para a obtenção calos com potencial embriogênico, muitos trabalhos obtiveram sucesso utilizando o 2,4 D isolado ou combinado com BAP como em *Saccharum* spp. (ALCANTARA et al. 2014), *Agave sisalana* (CARNEIRO et al. 2014), *Hilocereus undatus* (LOPES et al. 2016), *Byrsonima intermedia* (NOGUEIRA et al. 2007). Esses trabalhos reforçam os dados obtidos no presente estudo, evidenciando que explantes submetidos a condições de 2,4-D e BAP podem induzir a calogênese e posterior desenvolvimento em embriões somáticos. O 2,4-D tem sido utilizado na indução de embriogênese somática indireta porque interfere no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de

RNAs mensageiros que codificam proteínas que podem induzir a proliferação celular desordenada (GEORGE et al. 2008).

No experimento 2, além da citocinina BAP foi utilizada a auxina Picloram. A análise dos dados da Tabela 2 mostraram que o Picloram induziu a produção de calos. Esse regulador vegetal, também se mostrou eficiente na indução de calos com potencial embriogênico sendo usado isoladamente em *Eucalyptus grandis* (TITON et al. 2007), ou associada a outros reguladores como em *Musa acuminata* (REMAKANTHAN et al. 2013) no qual foi combinado com ANA e em *Pelargonium sidoides* (KUMAR et al. 2015) combinado com o Thidiazuron (TDZ).

Nesse trabalho, todos os experimentos obtiveram calos, entretanto, apenas o experimento para a organogênese indireta originou brotos (Figura 4 C-D). A obtenção de plantas via organogênese indireta pode trazer benefícios, pois os calos, por serem um tecido desorganizado, pode favorecer a obtenção de plantas com diferentes informações genéticas a depender da célula que se organize (GEORGE et al. 2008) . Além disso, essa variabilidade pode ser interessante para o mercado ornamental, pois aumenta a probabilidade de se obter variedades com características desejadas (ALBUQUERQUE, 2013). Os dados encontrados nesse trabalho contrastaram com os encontrados por Lima-Brito et al. (2011), no qual foi observado a presença de organogênese indireta em *C. mucugensis* em meio nutritivo suplementado apenas com 4,44 μM de BAP. No presente estudo a organogênese indireta foi observada no explante caule, porém, em meio nutritivo contendo 4,9 μM de ANA e os explantes submetidos somente a 4,44 μM de BAP emitiram calos, mas não originaram brotos.

Para a organogênese indireta de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, com o explante folha Albuquerque (2013), obteve o melhor resultado utilizando a concentração de 0,88 µM de BAP, que foi a maior concentração utilizada no seu trabalho. Esse resultado difere do que foi encontrado no presente estudo onde apenas na ausência de reguladores vegetais foi observado a regeneração de brotos e por organogênese direta (Tabela 03; Figura 4A). A diferença entre os resultados pode ter ocorrido devido a via organogênica poder ser determinada pela quantidade e a proporção de reguladores vegetais aplicados, o genótipo e até mesmo o local da excisão do explante (LEMA-RUMIŃSKA;KULUS, 2014), sendo necessários mais estudos sobre essa via de regeneração para o desenvolvimento de um protocolo eficiente.

A presença de centros meristemáticos, assim como a presença de células com núcleos (Figura 1 D) podem indicar um início de desorganização celular ou a diferenciação de células do sistema vascular (NEPOMUCENO, 2012). Isso pode ocorrer por, nos calos, alguns tipos de células especializadas voltarem a ocorrer de forma aleatória e se estiverem associadas a centros morfogênicos poderão originar órgãos, brotos e embriões (GEORGE et al. 2008).

Houve uma grande variação morfológica nos calos obtidos (Figura 2 A-D). A coloração opaca deve-se ao fato dos explantes terem sido mantidos no escuro para a indução de embriões somáticos. Já o formato de calos diferenciados pode ter sido em decorrência da ação das diferentes concentrações e combinações dos reguladores BAP e Picloran. Foi observada a formação de estruturas clorofiladas (Figura 2 E-F) que se assemelham a um broto. Morfologia similar foi encontrada por Kumar et al. (2015) que descrevem

a estrutura como sendo estágio cotilidonar do embrião reforçando a hipótese de que o Picloran pode ser um bom indutor de embriões somáticos.

A ausência de conexão vascular entre a planta mãe e o calo (Figura 3A) é mais um indício que explantes submetidos a 200 μ M de Picloran podem vir a originar embriões somáticos. Esse indício é reforçado por Vicient e Martinez (1998) que afirmaram que o desenvolvimento de embriões somáticos passa por estádios similares aos que ocorrem na embriogênese zigótica, caracterizando-se por não apresentar nenhuma conexão vascular com o tecido materno, o que foi observado neste trabalho, sugerindo que pode ter sido obtido um embrião somático por via indireta, ou seja, precedido pela fase de calo. Alguns estudos mostraram a ocorrência de embriogênese indireta como foi o caso de *Agave sisalana* (CARNEIRO et al. 2014), *Pelargonium sidoides* (KUMAR et al. 2015), *Ananas comosus* (YAPO et al. 2011), *Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine (REMAKANTHAN et al. 2013) e *Hilocereus undatus* (LOPES et al. 2016).

As condições de manutenção na ausência de luz e em meio nutritivo com altas concentrações de reguladores pode ter interferido no desenvolvimento de brotos ou embriões somáticos. Dessa forma, sugere-se que os calos com potencial embriogênico e/ou organogênico sejam transferidos para meio nutritivo adequado para induzir o desenvolvimento, e mantidos em condições de luminosidade que possibilitem o desenvolvimento dos calos em brotos ou embriões somáticos.

CONCLUSÕES

Os reguladores vegetais Picloran e 2,4-D induzem de calos com potencial embriogênico em *C. mucugensis*.

A indução de brotos *in vitro* de *C. mucugensis* Giul. Subsp. *mucugensis* via organogênese ocorre de forma direta e indireta.

O regulador vegetal ANA na concentração de 4,9 μM é eficiente na organogênese indireta para o explante caule.

A organogênese direta no explante folha ocorre em meio isento de regulador vegetal.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. M. S. Micropropagação e conservação *in vitro* de “sempre vivas” nativas da Chapada Diamantina - Ba. 2013. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.2013.
- ALCANTARA, G. B. et al. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum spp.*) cultivars RB855156 and RB72454. **Maringá**, v. 36, n. 1, p. 63-72, 2014.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. EMBRAPA. Planaltina: EMBRAPA Cerrado. **Documentos**. 58, 2002.
- BERAUD, M. M. R. et al. Inducción *in vitro* de calogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. **Bosque**, v. 35, n. 1, p. 111-118, 2014.
- CARNEIRO, F. D. S. et al. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 294-303, 2014.
- DIDONÉ, S. F. et al. Micropropagação de alcachofra a partir de plântulas germinadas *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 311-318, 2015.
- ECHTERNACHT, L. et al. Phylogeny and taxonomy of *Syngonanthus* and *Comanthera* (Eriocaulaceae): Evidence from expanded sampling. **Taxon**, v. 63, n. 1, p. 47–63, 2014.
- ESTRADA-LUNA, A. A. et al. In vitromicropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 378-385, 2008.
- FEITOSA, L. S. et al. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture** The Background. Dordrecht: Springer, 2008. 504.
- GHOLAMI, A. A. et al. Plant regeneration through direct and indirect somatic embryogenesis from immature seeds of citrus. **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 3, p. 307-310, 2013.
- GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 1, p. 179-193, 1988.
- GOLLE, D. P. et al. Seleção de lotes de sementes de *Pinus taeda* L. para a cultura de tecidos. **Cerne**, v. 20, p. 259-266, 2014.

- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940. 523.
- KHATTAB, S. et al. Genetic and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS-PAGE and HPLC. **Gene** v. 533 p. 313-321, 2014.
- KIRANMAI, C.; ARUNA, V.; PULLAIAH, T. Somatic embryogenesis and indirect organogenesis of *Caralluma pauciflora* Wight (Apocynaceae)-An endemic and rare plant. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 411-415 2015.
- KUMAR, V.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Somatic embryogenesis of *Pelargonium sidoides* DC. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v121, n3, p 571-577 2015.
- LEMA-RUMIŃSKA, J.; KULUS, D. Micropropagation of cacti - A review. **Haseltonia** v. 19, p. 46-63, 2014.
- LIMA-BRITO, A. et al. In vitro morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul: subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 502-510, 2011.
- LIMA, C. O. D. C. et al. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, v. 42, p. 249-254, 2012.
- LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaiá vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p. 21-25, 2016.
- MAILLOT, P.; KIEFFER, F.; WALTER, B. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. **Vitis**, v. 45, n. 4, p. 1519 2006.
- MARCHI, M. N. G. et al. Seed cryopreservation of the native cacti *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* from Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 21, p. 3250-3254, 2013.
- MARTINELLE, G.; MORAES, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil. **Centro nacional de conservação da flora**. p.498. 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473, 1962.
- NEPOMUCENO, C. F. Propagação e conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (MART. Ex BENT.) J.F.B. Pastore. 2012. 164p. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 366-370, 2007.
- O'BRIEN, T. P., FEDER, N., MCCULLY, M. E. . Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1965.
- OLIVEIRA, J., M. S. R. et al. Estratégia de competitividade do mercado de flores e plantas ornamentais: um estudo multifocal. **Conexão Ciência**, v. 6, p. 144-164, 2011.

PAIXÃO-SANTOS, J. et al. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP **Maringá**, v. 30, n. 2, p. 127-131, 2008.

PEREIRA, A. C. S.; BORBA, E. L.; GIULIETTI, A. M. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, p. 401-416, 2007.

PERULLO, N. et al. Seed cryopreservation and micropropagation of the critically endangered species swamp pink (*Helonias bullata* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, p. 284-293, 2015.

PINEDA, A. et al. Regeneración de *Ananas comosus* (L.) merr, ecotipo tabë känä, mediante organogénesis indirecta. **Bioagro**, v. 26, p. 135-142, 2014.

REMAKANTHAN, A. et al. Somatic embryogenesis in banana (*Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine): effect of explant and culture conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** v50, n.1, p 127–136, 2013.

TEIXEIRA, D. A. Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum* mediadas por rizobactérias em *Eucalyptus spp.* 2001. 67p. Tese de doutorado. , Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.

TITON, M. et al. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, p. 417-426, 2007.

VENTURA, G. M. Cultivo in vitro de Orquídeas do Grupo Cattleya, em Diferentes Meios de Cultura e Irradiâncias. 2007. 110p. Universidade Federal de Viçosa. Tese de doutorado. 2007.

YAPO, E. S. et al. Regeneration of pineapple (*Ananas comosus* L.) plant through somatic embryogenesis. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 196-204, 2011.

ZAYOVA, E. et al. Indirect shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal of Central European Agriculture**, v. 13, n. 3, p. 446-457, 2012.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO II

Conservação de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*

RESUMO

A família Eriocaulaceae apresenta distribuição pantropical podendo ter exemplares encontrados em campos rupestres, como *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. Essa é umas das espécies conhecidas como sempre-viva, pois suas flores mantem a aparência *in natura* meses após a coleta, sendo esse o motivo do intenso extrativismo que deixou a espécie em perigo de extinção. Nesse contexto, se faz necessário desenvolver estratégias de conservação para salvaguardar os recursos genéticos dessa espécie. Os objetivos desse trabalho foram: (1) avaliar a qualidade fisiológica de sementes e plantas de *C. mucugensis* armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C); (2) analisar o armazenamento, a longo prazo, de sementes em diferentes temperaturas; (3) identificar a melhor matriz de encapsulamento para plantas de *C. mucugensis*. Assim, sementes foram armazenadas em criotubos e imersos em nitrogênio líquido (-196°C) por 1; 7; 30; 360 e 540 dias e após o armazenamento inoculadas em meio de cultivo com metade das concentrações salinas (MS/2), exceto o controle que foi inoculado no mesmo dia. A germinação foi avaliada diariamente por 30 dias. Para avaliar o armazenamento, as sementes foram mantidas em temperatura ambiente, geladeira, freezer (-20°C), ultrafreezer (-80°C) e nitrogênio líquido (-196°C) por 30, 90 e 180 dias. Para a criopreservação de plantas foram utilizadas as técnicas de vitrificação e encapsulamento-desidratação. A criopreservação não comprometeu a qualidade fisiológica das sementes de *C. mucugensis*, entretanto, as técnicas utilizadas para criopreservar as plantas inteiras não foram eficientes. O armazenamento por até 180 dias não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos realizados.

Palavras-chave: Encapsulamento. Vitrificação. Sempre-viva. Nitrogênio Líquido.

ABSTRACT

The Eriocaulaceae family presents a pantropical distribution, being able to have specimens found in rupestrian fields such as *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. This is one of the species known as “sempre viva”, once its flowers maintain the *in natura* appearance months after the collection, causing an intense extractivism and left *C. mucugensis* as an endangered species. In this context, conservation strategies have to be developed to safeguard the genetic resources of this species. The objectives of this work were: (1) to evaluate the physiological quality of seeds and plants of *C. mucugensis* stored in liquid nitrogen (-196°C); (2) analyze the long-term storage of seeds at different temperatures; (3) identify the improved encapsulation matrix for *C. mucugensis* plants. Seeds of *C. mucugensis* were stored in cryotubes and immersed in liquid nitrogen for 1; 7; 30; 360 and 540 days and thereafter inoculated in Murashige and Skoog (1962) medium with half saline concentrations (MS / 2), except for the control that was directly inoculated in the same day. Germination was evaluated daily for 30 days. To evaluate the storage the seeds were preserved at room temperature, refrigerator, freezer (-20°C), ultrafreezer (-80°C) and liquid nitrogen (-196°C) for 30, 90 and 180 days. For the plants cryopreservation, were used the vitrification and encapsulation-desiccation techniques. Cryopreservation did not compromise the physiological quality of *C. mucugensis* seeds, however the techniques used to cryopreserve entire plants were not efficient. Storage for up to 180 days did not show statistical significant differences.

KEYWORDS: Encapsulation. Vitrification. “Sempre-viva”. Liquid Nitrogen.

INTRODUÇÃO

A família Eriocaulaceae apresenta cerca de 1400 espécies distribuídas em 10 gêneros, cujo centro de diversidade é a região da cadeia do espinhaço, localizada entre os estados de Minas Gerais e Bahia (GIULIETTI; HENSOLD, 1990; GIULIETTI et al. 2012). Muitas espécies dessa família são conhecidas como sempre-vivas por suas flores preservarem a aparência *in natura* por longos períodos após a colheita (GIULIETTI et al. 1996), característica que as tornam atrativas para o mercado ornamental. Dentre essas espécies encontra-se *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, planta endêmica do município de Mucugê, localizado na Chapada Diamantina, BA. Esta espécie sofreu com o intenso extrativismo para o abastecimento do mercado Japonês e Europeu na década de 80 (GIULIETTI et al. 1988). A contínua remoção da *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* do seu habitat e queimadas constantes na região contribuíram para que esta espécie seja considerada em risco de extinção (GIULIETTI et al. 1988; CERQUEIRA et al. 2008). A vulnerabilidade da espécie, que encontra-se em perigo de extinção (MARTINELLE; MORAES, 2013), torna imprescindível o estabelecimento de estratégias para a sua conservação.

A conservação *in situ* preserva a espécie em seu ambiente de ocorrência natural, preservando os processos físicos e biológicos que a conservação *ex situ* seria incapaz de salvaguardar, como, fatores evolutivos e interações ecológicas que podem ser estratégias complementares ou essenciais para a sobrevivência da espécie (MAXTED et al. 1997; RAVEN; HAVENS, 2014). Esta forma de conservação apresenta alguns vulnerabilidade como a necessidade de áreas extensas, mão de obra qualificada e recursos contínuos para a sua manutenção (ENGELMANN, 2011).

A conservação *ex situ*, ocorre fora do ambiente de ocorrência natural das espécies podendo conservá-las por médio ou longo prazo. Neste caso, deve-se preservar uma amostra representativa das populações naturais visando conservar a variabilidade genética, de forma que as características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas possam ser preservadas. Sementes, pólen e esporos de plantas são adequados para conservação a médio e longo prazo por causa de sua adaptação natural e por sustentar a viabilidade por longos períodos de tempo (HEYWOODA; IRIONDO, 2003).

A conservação *ex situ* pode ser utilizada para complementar a *in situ* quando se preserva amostras de populações naturais em bancos de germoplasma, como por exemplo, em bancos *in vitro*, banco de sementes e criobancos. A conservação de materiais vegetais em nitrogênio líquido (-196 °C), criopreservação, é eficiente quando se visa conservar os recursos genéticos a longo prazo (ENGELMANN, 1991; ENGELMANN 2011). Quando se conserva plantas visando a reintrodução delas no ambiente, o mais adequado é que essas plantas sejam obtidas por meio de germinação. Dessa forma, a criopreservação de sementes é adequada por conservar a diversidade genética, por requerer um espaço pequeno para seu armazenamento e, além disso, porque não expõe a planta ao estresse de um cultivo *in vitro* e a possíveis variações somaclonais (PERULLO et al. 2015).

Nos últimos anos, a criopreservação de sementes de espécies nativas ameaçadas foi o foco de alguns trabalhos com espécies nativas como cactáceas (MARCHI et al. 2013; CIVATTI et al., 2014; BÁRBARA et al. 2015), aroeira e baraúna (GONZAGA et al., 2003) e pau-ferro (LACERDA et al. 2002). Para um protocolo eficiente de criopreservação de sementes é necessário um estudo

prévio sobre suas propriedades físico-químicas e principalmente sobre o teor de umidade ideal (ENGELMANN, 2004). O excesso de água na semente pode interferir na tolerância à desidratação e ao congelamento em nitrogênio líquido causando danos às suas células e limitando a capacidade de sobrevivência dos tecidos vegetais (SANTOS, 2000).

Segundo Chetverikova (2011) há um elevado número de trabalhos sobre a viabilidade de sementes criopreservadas. No entanto, até junho de 2017 há apenas um trabalho com espécies da família Eriocaulaceae (DUARTE, 2009), cujo trabalho avaliou por 120 dias a conservação de sementes de *Syngonanthus elegans* e *Syngonanthus arthrotrichus* em temperatura ambiente, geladeira e nitrogênio líquido e mostrou que o armazenamento em geladeira e nitrogênio líquido pelo tempo testado não interferiu no comportamento fisiológico das sementes. A lacuna na literatura sobre esse método para a espécie e a importância da conservação de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* a longo prazo justifica o investimento em pesquisa com criopreservação.

Para a crioconservação de brotos faz-se necessário a utilização de técnicas que reduzam a quantidade de líquidos na célula antes do seu congelamento. A desidratação é um passo fundamental, pois dessa forma evita-se a cristalização do citosol e posterior rompimento das membranas celulares durante o processo de descongelamento (SANTOS, 2000). Dentre as técnicas utilizadas temos o congelamento lento, a vitrificação e o encapsulamento-desidratação (ENGELMANN, 2004) sendo os dois últimos utilizados no presente estudo.

A vitrificação, consiste em um processo no qual os líquidos passam a ser uma solução saturada e de alta viscosidade e por conta disso apresentam

propriedades mecânicas de um sólido sem a formação de uma estrutura cristalina, não ocorrendo mudanças bioquímicas (SANTOS, 2000). Para que ocorra a vitrificação, o material a ser congelado deverá ser exposto previamente a soluções crioprotetoras (ENGELMANN, 2010). As concentrações dessas soluções são elevadas de forma a garantir uma maior desidratação dos explantes e, além disso, o congelamento e o reaquecimento devem ser rápidos para garantir o sucesso do procedimento (SAKAI; ENGELMANN, 2007; SAKAI et al. 2008).

Dentre as soluções crioprotetoras mais comuns estão dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol e metanol (SANTOS, 2000; BENSON, 2008). Entretanto, essas substâncias em concentrações elevadas são tóxicas ao material biológico e as mesmas têm sido substituídas por carboidratos como sacarose, trealose e glicose (BENSON, 2008) que têm a vantagem de atuarem como agente vitrificante e não serem tóxicos às células (SANTOS, 2000).

O encapsulamento de propágulos (embriões somáticos, gemas apicais, tecidos meristemáticos e brotos) vem sendo utilizado para a conservação a longo prazo. Neste último, essa técnica é associada à criopreservação (SANTOS, 2000). O primeiro passo para a realização dessa técnica é verificar a melhor matriz de encapsulamento para formação da cápsula e se a mesma interfere no desenvolvimento da planta. Para que o explante seja congelado, é necessário um pré-cultivo do material encapsulado em solução hiperconcentrada de sacarose e posterior desidratação em fluxo laminar, onde o material encapsulado é previamente dessecado antes de ser submetido à temperatura ultrabaixa em nitrogênio líquido (-196°C) (SANTOS, 2000; ENGELMANN, 2004). Assim como

a técnica de vitrificação a desidratação inicial é determinante para o sucesso do processo.

A criopreservação pode ser uma ótima alternativa para a conservação *ex situ* de *C. mucugensis*, porém há outras formas de congelamento que podem ser tão eficientes quanto o congelamento em nitrogênio líquido e mais acessíveis. Neste contexto, o freezer (-20°C) e o ultrafreezer (-80°C), equipamentos comuns em instituições de ensino e pesquisa e/ou bancos de germoplasma, que podem ser locais adequados ao armazenamento. É importante ressaltar que para todos esses estudos se faz necessário também a avaliação das sementes em temperatura ambiente para verificar o quão eficiente é o protocolo desenvolvido.

Até a presente data não há registro na literatura de trabalhos sobre criopreservação de plantas de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* ou de outras espécies do gênero, seja através da vitrificação ou encapsulamento-desidratação, assim como não foram encontrados trabalhos que tenham avaliado a conservação de sementes da espécie estudada em diferentes condições de armazenamento.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a qualidade fisiológica das sementes armazenadas em nitrogênio líquido, aclimatizar plantas oriundas de sementes criopreservadas, avaliar a eficiência de soluções crioprotetoras na criopreservação de plantas, identificar o melhor explante e matriz de encapsulamento para plantas e, verificar se a técnica de encapsulamento-desidratação é eficiente para a criopreservação de plantas de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

As sementes de *C. mucugensis* foram coletadas no Projeto Sempre Viva, localizado no município de Mucugê, BA (12°59'83"S e 42°20'91"W) e mantidas em temperatura ambiente até a montagem dos experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia – LCTV-UFBA.

2. Criopreservação

2.1 *Criopreservação das sementes*

2.1.1 Teor de umidade

Foi avaliado o teor de umidade das sementes antes de serem congeladas em nitrogênio líquido (-196°C). A avaliação foi realizada de acordo com método da estufa a 105°C (Brasil, 2009), sendo pesadas 100 sementes foram pesadas em balança analítica para obter o peso fresco. Em seguida, as amostras foram mantidas em estufa a 105°C por 24 h e pesadas novamente para obter o peso seco. Para a obtenção do teor de umidade foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{100(P - p)}{P - t}$$

Onde:

P = peso inicial, peso do recipiente e das sementes úmidas;

p = peso final, peso do recipiente e das sementes secas;

t = tara, peso do recipiente

2.1.2 Congelamento em Nitrogênio Líquido

As sementes de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* foram armazenadas em criotubos e imersas em botijão contendo nitrogênio líquido (-196°C) e mantidas por 01, 07, 30, 360 e 540 dias, exceto o grupo controle que foi inoculado no mesmo dia. A manutenção das sementes em nitrogênio líquido foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia (LCTV-UFBA). Após a conclusão de cada período de armazenamento, os criotubos contendo as sementes foram removidos do nitrogênio líquido e descongelados à temperatura ambiente por uma hora. A etapa seguinte foi a desinfestação em fluxo laminar onde as sementes foram imersas por um minuto em etanol (70%) e por quinze minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), na sequência foram realizadas quatro lavagens em água estéril. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro (250 mL) contendo 50 mL de meio Murashige e Skoog (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas (MS/2) suplementado com 15 g L⁻¹ sacarose e gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio nutritivo foi ajustado entre 5,6 e 5,8 e, em seguida, esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C.

As unidades experimentais foram mantidas em câmara de germinação a 25 ± 3°C sob luz branca fluorescente (60 μmol m⁻² s⁻¹) e fotoperíodo de 16h por 30 dias.

2.1.3 Variáveis analisadas e análises estatísticas

Para a análise, foram consideradas germinadas as sementes nas quais era possível observar a emissão dos primórdios foliares com o auxílio de uma lupa. A germinação das sementes foi avaliada por 30 dias após a inoculação. As

variáveis analisadas consistiram em percentual de germinação ou germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG), coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) e distribuição da frequência acumulada (FA) da germinação (SANTANA; RANAL, 2000). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições de 25 sementes cada.

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2011).

2.2 Aclimatização de plantas oriundas de sementes criopreservadas

2.2.1 Material vegetal

Os explantes utilizados foram plantas obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes criopreservadas por 540 dias. Após a germinação, as plantas permaneceram por 60 dias no mesmo meio e, posteriormente, foram transferidas para meio de cultivo MS/2 suplementado com 4,9 μM ácido indol-butírico (AIB) 4,9 μM (Lima-Brito et al. 2016) e sacarose 15 g L⁻¹ e gelificado com ágar 7 g L⁻¹ onde permaneceram por mais 60 dias para enraizamento em câmara de germinação a $25 \pm 3^\circ \text{C}$ sob luz branca fluorescente ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16h.

2.2.2 Aclimatização

Foram transferidas para o ambiente *ex vitro* 90 plantas com aproximadamente 2 cm de parte aérea. O cultivo foi realizado em garrafas de polietileno (PET) de 2 L com tampa, que foram cortadas sendo a parte inferior

utilizada como vaso, onde foi colocado o substrato para cultivo, composto por areia e terra vegetal (1:1). Em cada vaso foram colocadas três plantas e em seguida a parte superior da garrafa PET foi encaixada sobre a inferior para manter a umidade. Após 15 dias da transferência as garrafas foram destampadas e transcorridos 30 dias a parte superior das garrafas foram removidas. As plantas foram mantidas sob sombreamento de 50% e regadas a cada dois dias.

2.2.3 Variáveis analisadas

Após 60 dias de transferência foram avaliados o percentual de sobrevivência, número de brotos e vigor, sendo este último mensurado visualmente, observando-se a coloração e o desenvolvimento das folhas e raízes.

2.3 Criopreservação de plantas

Foram colocados 15 brotos (5mm) oriundos da germinação *in vitro* em criotubos contendo diferentes soluções crioprotetoras (2M de glicerol; 0,4 M de sacarose ou 2M de glicerol + 0,4M de sacarose) por 20 minutos a 25°C (tabela 1). Em seguida foram submetidas a solução de vitrificação PVS2 (SAKAI et al. 1990) composta por 30% (w/v) de glicerol, 15% (w/v) de etilenoglicol e 15%(w/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) em meio MS/2 líquido suplementado com 0,4M de sacarose (pH 5,7), por 10 minutos em temperatura ambiente (25°C).

Os criotubos foram mantidos em tanques de nitrogênio líquido por 7 dias. Os mesmos foram descongelados em temperatura ambiente por 40 minutos seguidos de 15 minutos em banho-maria a 40°C. No fluxo laminar, os explantes foram retirados dos criotubos e lavados em meio MS/2 líquido suplementado com

0,4M de sacarose (pH 5,7) e, posteriormente, inoculados em potes de vidro contendo 50 mL de meio de cultura MS/2 suplementado com sacarose 15 g L⁻¹ e gelificado com ágar 7 g L⁻¹. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições de três repetições cada. As unidades experimentais foram mantidas por 30 dias em sala de crescimento a 24 ± 3°C sob luz fluorescente branca (60 μmol m⁻² s⁻¹) e 16 horas de fotoperíodo.

Tabela 1. Criopreservação de plantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* submetidas a diferentes soluções de osmoproteção, solução de vitrificação (PVS2) e nitrogênio líquido (-196°C).

Tratamentos	Soluções de Osmoproteção	Soluções de Vitrificação	Nitrogênio Líquido
Controle 1	-	-	-
Controle 2	-	-	Sim
T1	Glicerol	PVS2	Sim
T2	Sacarose	PVS2	Sim
T3	Glicerol+ sacarose	PVS2	Sim

3. Conservação de sementes em diferentes ambientes

O teor de umidade foi determinado conforme descrito no item 2.1.1.

As sementes foram separadas em grupos de 75 e posteriormente conservadas em oito diferentes ambientes por 30, 90 e 180 dias. Cada ambiente foi considerado um tratamento conforme a descrição que segue:

- T1:** Temperatura ambiente em criotubo - Controle
- T2:** Temperatura ambiente em criotubo contendo sílica
- T3:** Temperatura ambiente em saco de papel
- T4:** Temperatura ambiente em saco de papel e imerso em sílica
- T5:** Geladeira em criotubo (4°C)
- T6:** Freezer em criotubo (-20°C)
- T7:** Ultrafreezer em criotubo (-80°C)
- T8:** Nitrogênio líquido em criotubo (-196°C)

Ao término de cada período de armazenamento, as sementes foram desinfestadas em álcool (70%) por 1 minuto e hipoclorito de sódio (2,5%) por 15 minutos seguidos de três lavagens com água estéril. Posteriormente as sementes foram inoculadas em potes de vidro (250 mL) contendo 50 mL de meio MS/2, suplementado com 15 g L⁻¹ sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio nutritivo foi ajustado entre 5,6 e 5,8 e, em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C.

O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições de 25 sementes cada. As unidades experimentais foram mantidas em câmara de germinação a 25 ± 3°C sob luz branca fluorescente (60 μmol m⁻² s⁻¹) e fotoperíodo de 16h por 30 dias.

Foram consideradas germinadas as sementes nas quais era possível observar a emissão dos primórdios foliares com auxílio de uma lupa.

As variáveis estatísticas analisadas foram as mesmas descritas no item 2.1.3.

4. Encapsulamento de plantas

4.1 Material vegetal

As plantas oriundas da germinação *in vitro* foram cultivadas em meio de cultura MS/2 e mantidas em sala de crescimento a $24 \pm 3^\circ\text{C}$ sob luz fluorescente branca ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 16 horas de fotoperíodo.

4.2 Encapsulamento

Foram utilizadas plantas com dois períodos de desenvolvimento: P1 - 15 dias (3mm) e P2 - 45 dias (5mm) após a germinação. Para cada período de desenvolvimento da planta foram realizados os seguintes tratamentos descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos utilizados para o encapsulamento de plantas de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*.

Tratamento	Matriz Alginato de sódio (1%)	Ambiente de conservação
T1		Temperatura Ambiente
T2	Diluído em água	Freezer (-20°C)
T3		Nitrogênio Líquido (-196°C)
T4		Temperatura Ambiente
T5	Diluído em Meio MS	Freezer (-20°C)
T6		Nitrogênio Líquido (-196°C)
T7		Temperatura Ambiente
T8	Diluído em Meio MS/2	Freezer (-20°C)
T9		Nitrogênio Líquido (-196°C)

As plantas P2 tiveram parte das folhas e as raízes cortadas antes do encapsulamento, enquanto que, as plantas P1 foram encapsuladas sem cortes. Primeiramente as plantas foram colocadas na matriz de alginato de sódio (1%). Com o auxílio de uma micropipeta as plantas foram aspiradas e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (100 mM) e mantidas por 20 min.

Após essa etapa, os explantes encapsulados, que não seriam congelados, foram colocados em criotubos e mantidos em temperatura ambiente. O material encapsulado e congelado, foi transferido para um Erlenmeyer contendo 50 ml de solução de sacarose 0,75M, mantidas na ausência de luz sob agitação de 70 rpm por 24h. transcorrido esse período foi colocado em papel filtro e disposto em placas de Petri para secagem em fluxo laminar por quatro horas. Em seguida, as cápsulas foram colocadas em criotubos e congeladas em freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C) por 24h. O descongelamento foi realizado em banho-maria (38°C) por 2min.

Transcorrido o tempo de armazenamento as cápsulas, tanto as que ficaram à temperatura ambiente quanto as que foram congeladas, foram colocadas em solução de nitrato de potássio (100 mM) para descomplexação por 15 min, seguidas de três lavagens em água estéril. Foram inoculadas cinco cápsulas em potes de vidro (250 mL) contendo 50 mL de meio MS/2, suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e gelificado com 7 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio nutritivo foi ajustado entre 5,6 e 5,8 e o meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C.

As unidades experimentais foram mantidas em câmara de germinação a 25 ± 3°C sob luz branca fluorescente (60 μmol m⁻² s⁻¹) e fotoperíodo de 16h por 45 dias.

4.3 Variáveis analisadas

A cada 15 dias foram avaliados a sobrevivência (%) e desenvolvimento das folhas e raiz.

RESULTADOS

1. Criopreservação

1.1 Criopreservação das sementes

O teor de umidade apresentado pelas sementes de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* foi de 8,62%.

A porcentagem de germinação foi elevada e não apresentou diferença estatística entre o controle (94%) e as sementes armazenadas nos demais tratamentos, apresentando um mínimo de 79% (540 dias) e um máximo de 97% (01 dia) de germinação (Figura 01).

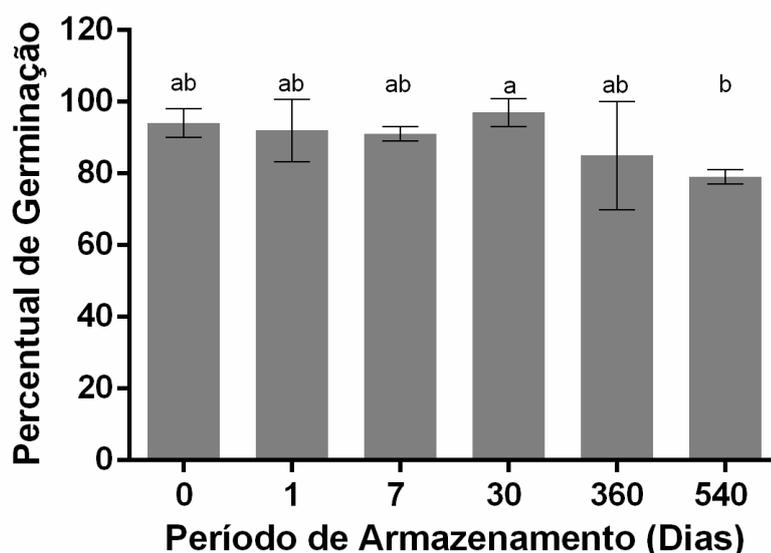


Figura 1: Germinação de sementes de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) por 0, 1, 7, 30, 360 e 540 dias. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

A frequência acumulada da germinação (Figura 2) permite inferir que as sementes não submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido (controle) começaram a germinar precocemente, a partir do terceiro dia. Enquanto as sementes criopreservadas por 1, 7, 30, 360 e 540 dias começaram a germinar a partir do sétimo dia. Embora tenha havido diferença no tempo inicial da germinação, tanto o controle quanto as sementes criopreservadas apresentaram o pico de germinação na semana subsequente às primeiras sementes emitirem os primórdios foliares. Após esse período, a taxa de germinação das sementes estagnou (Figura 2). Os dados evidenciam que a exposição a nitrogênio líquido (-196 °C) não interferiu na qualidade fisiológica das sementes conservadas por até 540 dias, apesar deste tratamento ter sofrido uma pequena redução na porcentagem de germinação.

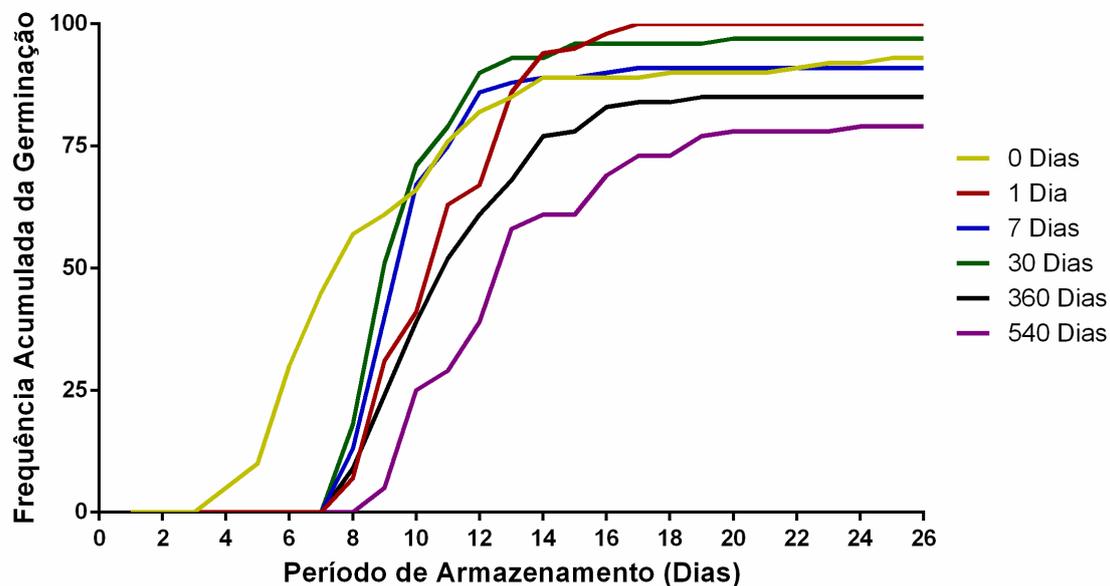


Figura 2: Distribuição da frequência acumulada (FA) da germinação de sementes de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* ao longo do tempo de armazenamento. Os valores de FA representam a somatória das quatro repetições simultâneas.

O tratamento que apresentou um menor tempo médio de germinação foi o controle (8,79), no entanto, este não diferiu significativamente das sementes armazenadas por 7 (10,00) e 30 dias (9,97), sendo estatisticamente diferentes dos demais tratamentos: 1 (11,19), 360 (11,23) e 540 (12,83) dias (Tabela 3). Esses dados nos mostram que o tempo médio da germinação aumentou à medida que aumentou o tempo de armazenamento.

A variável índice de velocidade média de germinação foi similar entre o controle (3,09) e as sementes criopreservadas por 1 (2,15), 360 (1,97) e 540 dias (1,62) sendo estatisticamente diferentes dos demais períodos de armazenamento.

Tabela 3. Efeito do período de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) no tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*.

	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	1	7	30	360	540
TMG	8,79 ^c	11,19 ^{ab}	10,00 ^{bc}	9,97 ^{bc}	11,23 ^{ab}	12,83 ^a
IVG	3,09 ^c	2,15 ^{bc}	2,32 ^b	2,51 ^{ab}	1,97 ^{bc}	1,62 ^c
CUG	0,090 ^b	0,165 ^{ab}	0,509 ^a	0,373 ^{ab}	0,180 ^{ab}	0,122 ^b

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) diferiu apenas entre o controle (0,90) e o armazenamento por 7 dias não apresentando diferença

estatística entre o controle e os demais períodos de armazenamento em nitrogênio líquido. Nos tempos avaliados o CUG variou de 0,509 a 0,090 para as sementes armazenadas por 7 dias e o tratamento controle, respectivamente.

A criopreservação não interferiu no desenvolvimento e na morfologia das plantas em nenhum período de armazenamento (Figura 3). As plantas que germinaram emitiram raízes e folhas que apresentaram a coloração verde escura.

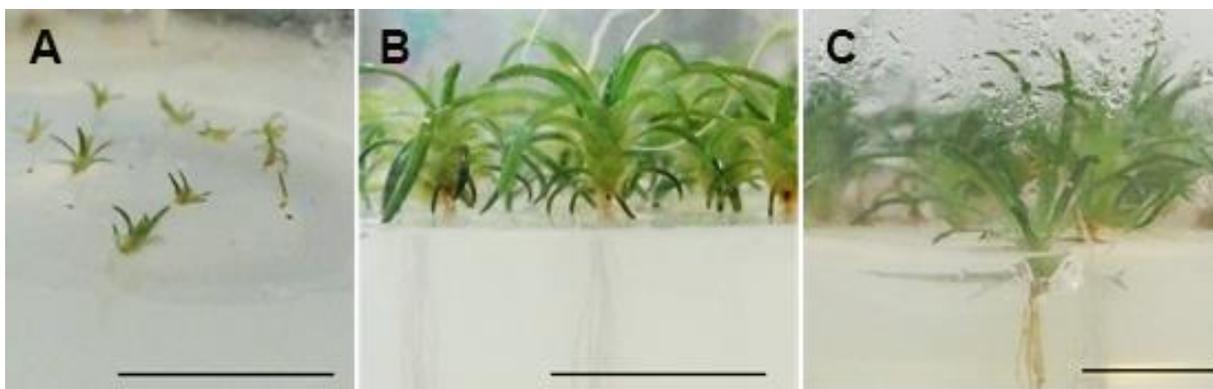


Figura 3. Desenvolvimento de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* originadas a partir de sementes criopreservadas por 540 dias, com 30 (A), 90 (B) e 180 dias (C) após a germinação. (Barra: 1cm).

1.2 Aclimatização

A porcentagem de sobrevivência das plantas foi de 66,66 %. As plantas apresentaram vigor, evidenciado por um bom desenvolvimento das raízes e da parte aérea. Houve predomínio da coloração verde nas folhas sendo um tom mais claro no centro e mais escuro nas extremidades. Apenas três plantas apresentaram brotos e a média foi de dois brotos por planta.

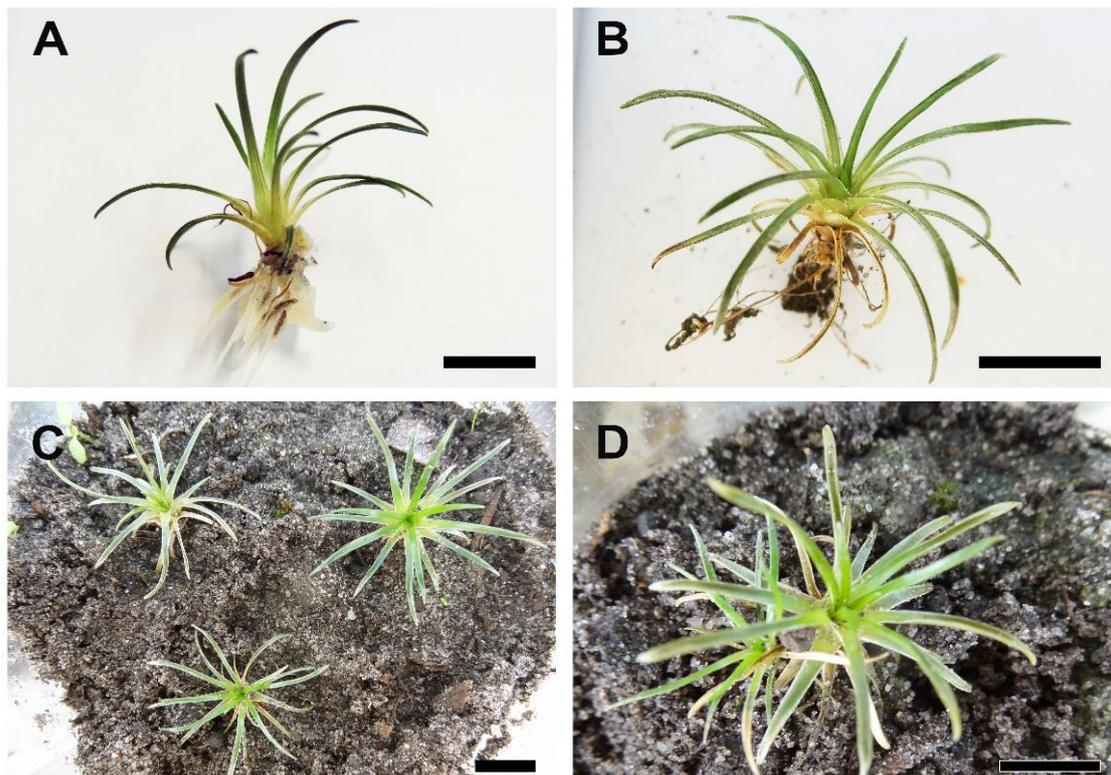


Figura 4. Plantas aclimatizadas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* originadas a partir de sementes criopreservadas por 540 dias. Planta no dia da transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (A); planta com 60 dias após a transferência para o ambiente *ex vitro* (B-C); e planta com broto (D). (Barra: 1 cm).

1.3 Criopreservação de Plantas

As plantas não resistiram ao congelamento em nitrogênio líquido, mesmo submetidas às diferentes soluções de carregamento e a solução de vitrificação. Após 30 dias de cultivo apenas as plantas do tratamento controle sobreviveram (Figura 5).

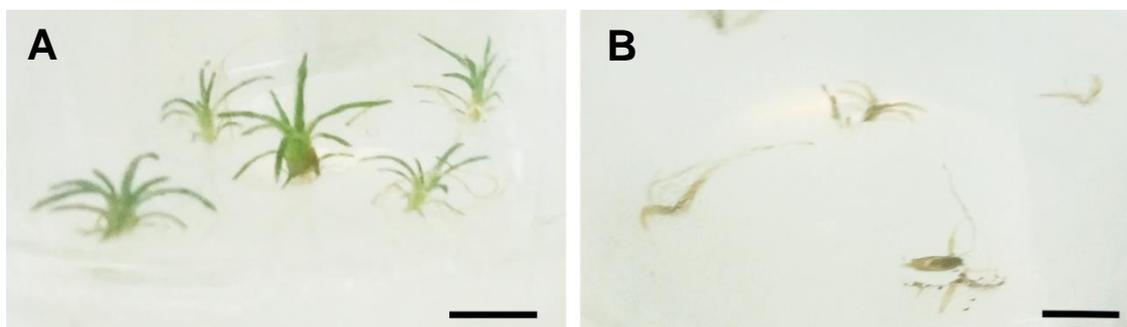


Figura 5. Brotos de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* derivados do tratamento controle (A) e conservados em nitrogênio líquido (B) (Barra: 1 cm).

2. Conservação de sementes em diferentes ambientes

O teor de umidade apresentado pelas sementes de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, 15 dias após a coleta foi de 9,67%.

Não houve interação significativa entre os fatores tempo e ambientes de armazenamento para a variável percentual de germinação. Apenas o fator isolado tempo interferiu significativamente. É possível observar (Figura 6) que nos tratamentos em que as sementes não foram congeladas (T1, T2, T3, T4 e T5) houve uma redução no percentual de germinação quando comparados os resultados do armazenamento por 90 e 180 dias, sendo esse resultado o oposto ao encontrado para as sementes que foram congeladas (T6, T7 e T8).

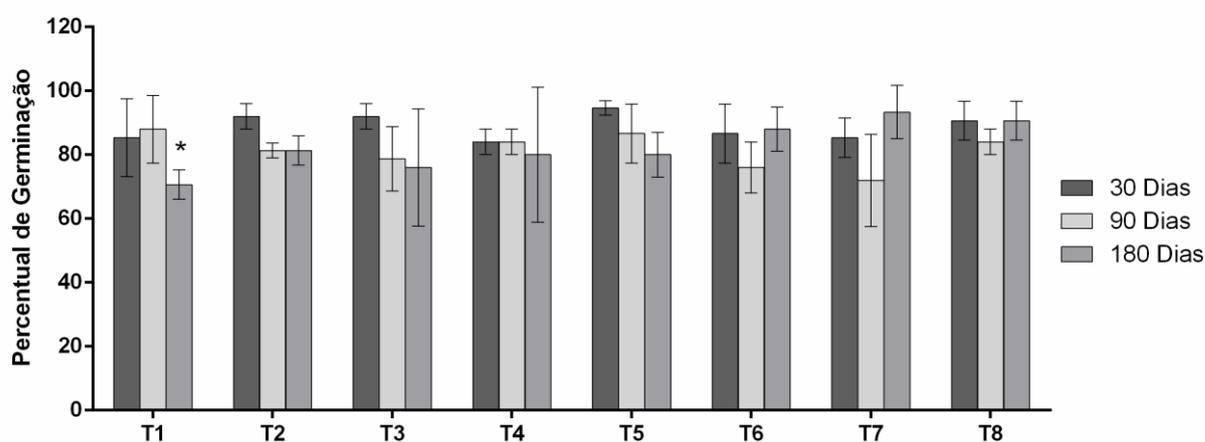


Figura 6. Germinação de sementes de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* conservadas em oito ambientes por três diferentes períodos: 30, 90 e 180 dias. T1: Temperatura ambiente em criotubo – Controle; T2: Temperatura ambiente em criotubo contendo sílica; T3: Temperatura ambiente em saco de papel; T4: Temperatura ambiente em saco de papel e imerso em sílica; T5: Geladeira em criotubo (4°C); T6: Freezer em criotubo (-20°C); T7: Ultrafreezer em criotubo (-80°C); e T8: Nitrogênio líquido em criotubo (-196°C). (*) O tempo foi significativamente diferente dentro do tratamento.

A frequência acumulada da germinação (Figura 7) permite inferir que as sementes do tratamento 1 (T1) tendem a germinar antes das dos demais tratamentos em todos os períodos de armazenamento avaliados.

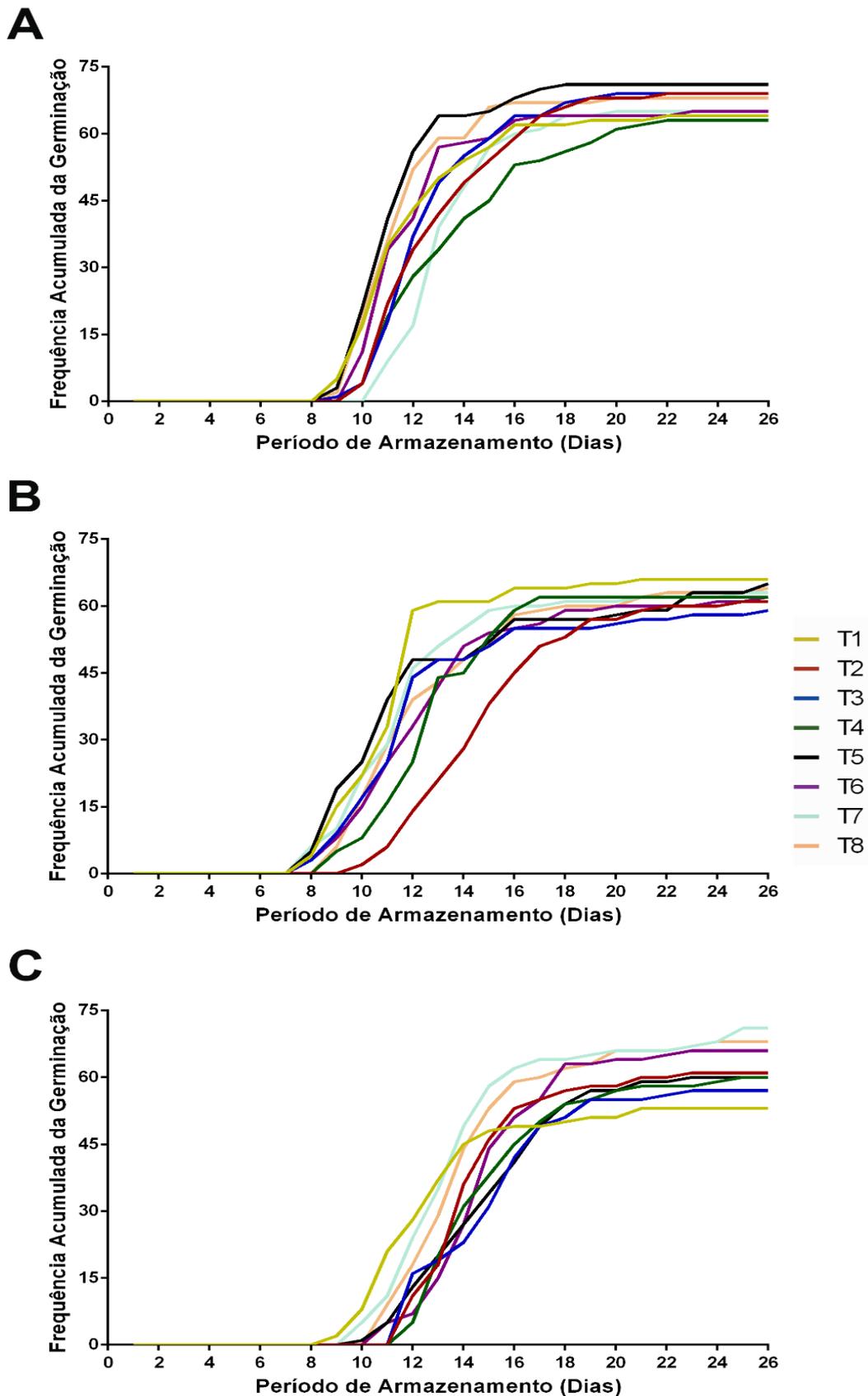


Figura 7. Distribuição da frequência acumulada (FA) da germinação de sementes de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* ao longo do tempo por 30 (A), 90 (B) e 180 (C) dias. Os valores de FA representam a somatória das quatro repetições simultâneas.

Apesar dessa diferença no início da germinação, todos os tratamentos obtiveram o pico de germinação na semana seguinte à primeira semente emitir os primórdios foliares. Transcorrido esse momento poucas sementes germinaram. Após 180 dias de armazenamento, o número de sementes germinadas foi mais elevado nos tratamentos cujas sementes foram congeladas (T6, T7 e T8), e o T1 apresentou uma redução significativa no número de sementes germinadas em relação às sementes armazenadas por 30 e 90 dias.

Em relação ao tempo médio de germinação, houve uma interação significativa entre o tempo e os ambientes de armazenamento. Os tratamentos que apresentaram um menor tempo médio de germinação foram o armazenamento por 30 dias, T8 (11,75) e T5 (11,63) e por 90 dias, T1 (11,38), T3 (12,25), T5 (12,57), T6 (12,74) e T7 (11,82). (Tabela 4).

A variável índice de velocidade de germinação (IVG) apresentou interação significativa entre os fatores. Os melhores valores apresentados foram, quando avaliados por 30 dias, o T5 (2,081) e quando avaliados por 90 dias, foi o tratamento T1 (2,010). Para as sementes armazenadas por 180 dias o IVG variou entre 1,276 (T3) e 1,737 (T7) (Tabela 4).

O coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) em relação ao tempo, apresentou diferença estatística entre o T8 e os demais tratamentos no período 90 (0,081) e 180 (0,169) dias de armazenamento, porém não diferiu significativamente entre os ambientes de armazenamento quando as sementes foram armazenadas por 30 (0,2881) dias (Tabela 4). Nos tratamentos em três tempos de armazenamento distintos avaliados o CUG variou de 0,2924 a 0,0624.

Tabela 4. Efeito do tempo de armazenamento no tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. T1: Temperatura ambiente em criotubo – Controle; T2: Temperatura ambiente em criotubo contendo sílica; T3: Temperatura ambiente em saco de papel; T4: Temperatura ambiente em saco de papel e imerso em sílica; T5: Geladeira em criotubo (4°C); T6: Freezer em criotubo (-20°C); T7: Ultrafreezer em criotubo (-80°C); e T8: Nitrogênio líquido em criotubo (-196°C).

Tempo de armazenamento (dias)	Tempo Médio de Germinação								Média
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
30	12,05 ^{abA}	13,34 ^{abB}	12,97 ^{abB}	13,83 ^{aB}	11,63 ^{bB}	12,09 ^{abB}	13,57 ^{abA}	11,75 ^{bB}	12,65 ^b
90	11,38 ^{bA}	14,99 ^{aA}	12,25 ^{bB}	13,07 ^{abB}	12,57 ^{bB}	12,74 ^{bB}	11,82 ^{bB}	13,20 ^{abAB}	12,75 ^b
180	12,70 ^{bA}	14,61 ^{abAB}	15,24 ^{aA}	15,07 ^{aA}	15,12 ^{aA}	15,01 ^{aA}	13,93 ^{abA}	14,25 ^{abA}	14,49 ^a
Média	12,04 ^C	14,31 ^A	13,49 ^{AB}	13,99 ^{AB}	13,11 ^{BC}	13,28 ^{AB}	13,11 ^{BC}	13,07 ^{BC}	

Índice de Velocidade de Germinação (IVG)									
30	1,831 ^{abA}	1,784 ^{abA}	1,822 ^{abA}	1,587 ^{bA}	2,081 ^{aA}	1,832 ^{abA}	1,602 ^{abA}	1,973 ^{abA}	1,814 ^a
90	2,010 ^{aA}	1,409 ^{bB}	1,696 ^{abA}	1,663 ^{abA}	1,910 ^{aA}	1,720 ^{abA}	1,863 ^{abA}	1,788 ^{abA}	1,757 ^a
180	1,439 ^{aB}	1,422 ^{aAB}	1,276 ^{aA}	1,353 ^{aA}	1,373 ^{aB}	1,494 ^{aA}	1,737 ^{aA}	1,639 ^{aA}	1,467 ^b
Média	1,760 ^A	1,538 ^A	1,598 ^A	1,534 ^A	1,788 ^A	1,682 ^A	1,734 ^A	1,800 ^A	

Coeficiente de Uniformidade da Germinação (CUG)									
30	0,171 ^{aA}	0,161 ^{aA}	0,222 ^{aA}	0,117 ^{aA}	0,292 ^{aA}	0,260 ^{aA}	0,277 ^{aA}	0,288 ^{aA}	0,224 ^a
90	0,224 ^{aA}	0,137 ^{aA}	0,148 ^{aA}	0,229 ^{aA}	0,062 ^{aB}	0,151 ^{aA}	0,154 ^{aA}	0,081 ^{aB}	0,148 ^b
180	0,190 ^{aA}	0,218 ^{aA}	0,187 ^{aA}	0,168 ^{aA}	0,185 ^{aAB}	0,219 ^{aA}	0,166 ^{aA}	0,169 ^{aAB}	0,188 ^{ab}
Média	0,195 ^A	0,172 ^A	0,186 ^A	0,171 ^A	0,180 ^A	0,210 ^A	0,199 ^A	0,179 ^A	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

3. Encapsulamento

A melhor matriz de alginato de sódio (1%) para o desenvolvimento das plantas de *C. mucugensis* após o encapsulamento foi a de alginato de sódio diluído em meio MS/2 (Tabela 3), pois a porcentagem de sobrevivência foi maior do que os demais tratamentos.

Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência das plantas encapsuladas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, com diferentes idades 15 dias (**P1**) e 45 dias (**P2**), avaliadas após 15, 30 e 45 dias da inoculação.

		SOBREVIVÊNCIA (%)									
		Controle	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
15 DIAS	P1	100	0	0	0	60	0	0	40	0	0
	P2	100	0	0	0	40	0	0	100	0	0
30 DIAS	P1	80	0	0	0	40	0	0	40	0	0
	P2	100	0	0	0	40	0	0	100	0	0
45 DIAS	P1	80	0	0	0	40	0	0	20	0	0
	P2	100	0	0	0	40	0	0	80	0	0

Os explantes encapsulados com matriz de alginato de sódio (1%) diluído em água não regeneraram (Figura 8A) mesmo quando mantidos em temperatura ambiente, diferente dos explantes encapsulados com a matriz diluída em meio MS (T4) e meio MS/2 (T7) que apresentaram taxa de regeneração (Figura 8 B, C, E e F) similar ao controle (Figura 8D).

Quando os explantes encapsulados foram submetidos ao congelamento (T3, T6 e T9) não regeneraram, demonstrando que encapsulamento+desidratação não foram eficientes para a conservação das plantas de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* em temperaturas de congelamento (-20°C e -196°C).

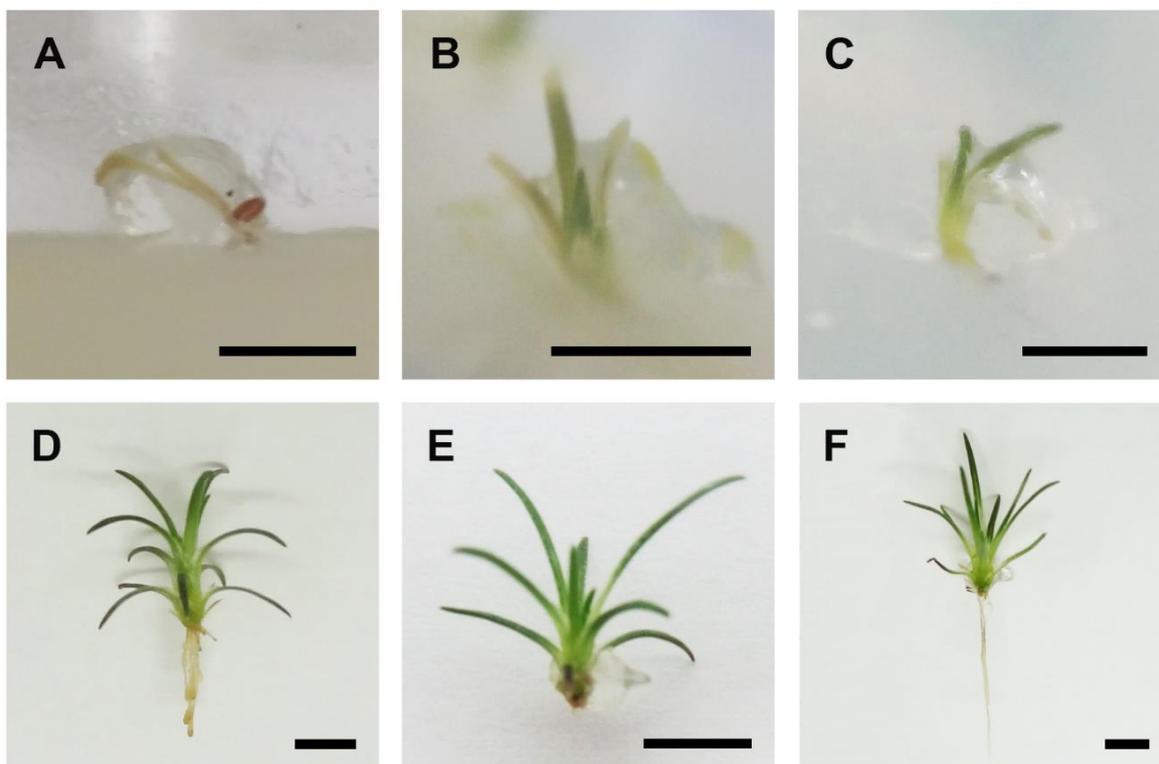


Figura 8. Explantes encapsulados de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, após 15 dias de inoculação, com matriz de alginato de sódio (1%): diluído em água – T1 (A), diluído em meio MS – T4(B) e diluído em meio MS/2 – T7 (C); explantes 45 dias após a inoculação: Controle (D), T4 (E) e T7 (F). Barra: 2mm.

DISCUSSÃO

1. Criopreservação

1.1 Criopreservação das sementes

Sementes com baixo teor de umidade são mais propícias à criopreservação por reduzir a possibilidade de formação de cristais de gelo

intracelulares durante o congelamento. A ruptura do sistema de endomembranas resulta em perda da permeabilidade seletiva e compartimentalização celular, o que danifica o tecido vegetal (SANTOS, 2000; GOLDFARB et al. 2010; KAVIANI et al. 2009) e inviabiliza o desenvolvimento de uma nova planta. Desta forma, a manutenção da viabilidade das sementes de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* pode ser atribuída ao baixo teor de umidade (8,62%). Resultados similares foram encontrados por Duarte (2009) para a criopreservação por até 120 dias de sementes de *Comanthera elegans*, que apresentaram teor de umidade de 10,4%. Em contraste, no mesmo trabalho, sementes de *Syngonanthus arthrotricus*, com teor de umidade de 16,9%, apresentaram qualidade fisiológica reduzida, o que evidencia que quantidade de água presente nas sementes é um fator determinante para a criopreservação. Outros trabalhos foram bem-sucedidos na criopreservação utilizando sementes com baixo teor de umidade como, por exemplo, as de *P. pachycladus* (BÁRBARA et al. 2015), *Stephanocereus luetzelburgii* (MARCHI et al. 2013), *Astronium urundeuva* *Schinopsis brasiliensis* (GONZAGA et al., 2003) e *Caesalpinia leiostachya* (LACERDA et al. 2002).

As sementes ortodoxas, por apresentarem um processo de desidratação natural, podem ser imersas em nitrogênio líquido (-196°C) sem a utilização de crioprotetores, o que seria uma vantagem, visto que os processos de crioproteção são onerosos e mais laboriosos (ENGELMANN, 2004; ENGELMANN, 2011; SILVA et al., 2014). Isso ocorre porque durante seu desenvolvimento, sementes ortodoxas desidratam-se e acabam adquirindo tolerância ao dessecação na fase de maturação (SONG-QUAN et al. 2003; KERBAUY, 2004). A resistência à perda de água pode dever-se às

características físicas como a redução no grau de vacuolização, quantidade e natureza das reservas insolúveis acumuladas, conformação do DNA, cromatina e arquitetura nuclear, dentre outras (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

O fato de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* ter sementes ortodoxas possibilitou a manutenção das taxas germinativas praticamente constantes entre os diferentes períodos de armazenamento em nitrogênio líquido. Segundo Chetverikova (2011) cerca de 86% dos trabalhos envolvendo criopreservação de sementes não encontraram mudanças nas taxas germinativas, mesmo quando criopreservadas por períodos superiores a 360 dias. Além disso, alguns trabalhos com espécies nativas encontraram resultados favoráveis à criopreservação de sementes em cactáceas (VEIGA-BARBOSA et al. 2010; MARCHI et al. 2013; BÁRBARA et al. 2015), *Caesalpinia leiostachya* (LACERDA et al. 2002), *Apuleia leiocarpa* (SALOMÃO, 2002), *Bixa orellana* (CORLETT, 2004), *Jatropha curcas* (PRADA et al. 2015) e *Zephyranthes sylvatica* (SILVA et al., 2014). Estes dados reiteram que a criopreservação das sementes de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* pode ser uma alternativa viável para conservação da espécie a longo prazo.

Não houve diferença significativa entre o controle e o armazenamento por 540 dias (Figura 1). A imersão em nitrogênio líquido ocasionou um retardo no início da germinação (Figura 2), e o tempo médio de germinação foi mais elevado para as sementes que permaneceram mais tempo a -196°C. O índice de velocidade de germinação (IVG) regrediu ao longo dos períodos de armazenamento (Tabela 3). Esses resultados divergem dos encontrados para a criopreservação de *D. zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii* por até 30 dias (VEIGA-BARBOSA et al. 2010; MARCHI et al. 2013;

BÁRBARA et al. 2015) onde não houve diferenças significativas para o TMG e de *C. elegans* por até 120 dias (DUARTE, 2009), que não encontrou diferença estatística para o IVG. Os tratamentos controle e com 540 dias apresentaram coeficiente de uniformidade de germinação estatisticamente diferentes do armazenamento por 7 dias. Esses dados diferenciam-se dos encontrados para *P. pachycladus* (BÁRBARA et al. 2015) e *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* (MARCHI et al. 2013), onde para o CUG não foram encontradas diferenças estatísticas.

A criopreservação de sementes não causou diferenças morfológicas (Figura 3) no desenvolvimento das plantas quando comparadas com o controle. Esse dado evidencia que esta técnica pode ser utilizada com sucesso para *C. mucugensis*, justificando a sua utilização para conservação *ex situ* a longo prazo.

1.2 Aclimatização

As plantas *C. mucugensis* oriundas de sementes criopreservadas apresentaram uma taxa de sobrevivência de 66,66%. Resultados similares foram encontrados por Lima-Brito et al. (2016), onde plantas de *C. mucugensis* submetidas às mesmas condições apresentaram 73,28% de sobrevivência após 90 dias. Outros autores relatam que a aclimatização de *Comanthera elegantulus* apresentou 73,9% de sobrevivência após 30 dias de cultivo em areia (PÊGO et al. 2013). Em ambos os trabalhos, os autores concluíram que as espécies estudadas não necessitam de uma etapa prévia de rustificação para serem aclimatizadas.

A taxa de sobrevivência na aclimatização das sempre-vivas pode dever-se às características xeromórficas mantidas pelas folhas e a funcionalidade dos

estômatos o que impediu a perda de água durante a aclimatização (Lima-Brito et al. 2011). Nos experimentos de aclimatização com *C. mucugensis* e *C. elegantulus* foram utilizadas garrafas PET e sacos plásticos transparentes, respectivamente, que mantiveram a umidade do ar elevada (LIMA-BRITO et al. 2011; PÊGO et al. 2013), o que reduziu a possibilidade de escassez hídrica nas plantas. A exposição à intensa luminosidade solar pode limitar o desenvolvimento das plantas durante a transição do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*. Por isso, o cultivo em ambiente com 50% de luz pode ter sido fundamental para a sobrevivência das plantas.

Os resultados obtidos, quando comparados a trabalhos prévios onde não houve o congelamento das sementes, mostram que o congelamento em nitrogênio líquido não interfere na fisiologia das sementes, fazendo as mesmas originarem plantas saudáveis e com condições de se desenvolver no ambiente *ex vitro*.

1.3 Criopreservação de plantas

A conservação de estruturas mais complexas da planta exige procedimentos que permitam uma desidratação elevada para evitar o rompimento da membrana celular durante o descongelamento. Um dos procedimentos utilizados é a vitrificação, que impede a cristalização da água nos explantes devido à sua exposição prévia a soluções crioprotetoras (ENGELMANN, 2010). Essas soluções são saturadas e é necessário que o congelamento e o descongelamento sejam realizados de forma rápida para que se obtenha êxito com o procedimento (SAKAI; ENGELMANN, 2007; SAKAI et al. 2008).

No presente trabalho foram testadas soluções de glicerol e sacarose como crioprotetoras para plantas de *C. mucugensis*, entretanto, não foi obtido sucesso com nenhuma das substâncias. No caso do glicerol, a solução concentrada pode ter sido tóxica para as células da planta (SANTOS, 2000; BENSON, 2008) o que inviabilizou sua sobrevivência. Como a sacarose não gera toxicidade à planta, a morte dos tecidos pode ter sido ocasionada pela cristalização dos líquidos intracelulares ocasionando o rompimento das membranas celulares e posterior morte celular (SANTOS, 2000), o que também pode ter ocorrido com as plantas do glicerol.

A solução de vitrificação utilizada, PVS2, pode ter influenciado a morte da planta após o congelamento (SANTOS et al. 2015). Essa substância além de importante para a desidratação é essencial para evitar a cristalização da água e reduz a mobilidade de moléculas permitindo vitrificação celular durante a imersão em nitrogênio líquido (VOLK; WALTERS, 2006). Alguns trabalhos sugerem que um maior tempo de exposição em PVS2 pode influenciar no sucesso do reestabelecimento da planta após o congelamento (SANTOS et al. 2015; ANTONY et al. 2010). No presente trabalho os explantes ficaram expostos a essa solução por apenas 10 minutos, esse tempo pode não ter sido suficiente para a vitrificação do conteúdo celular, pois provavelmente não atingiu as células mais centrais do explante, deixando estas células suscetíveis aos efeitos deletérios do gelo.

Segundo Santos (2000), explantes de tamanho reduzido são mais eficientes para o congelamento. Essa vantagem ocorre porque há uma completa penetração da solução de vitrificação, além de permitir que a desidratação e o congelamento ocorram de forma mais rápida e eficiente. Dessa forma, o

tamanho da planta também pode ter influenciado no insucesso da crioconservação de plantas de *C. mucugensis*. Entretanto, não há consenso sobre o melhor tamanho de explante para congelamento. Trabalhos como o de Ray e Bhattacharya (2008) com segmentos nodais de *Rauvolfia serpentina* e Antony et al. (2010) concluíram que explantes com 3-4mm foram os melhores, mesmo tendo testado tamanho menores o que difere do exposto por Santos (2000) que menores explantes são sempre melhores para a criopreservação. Esses resultados nos evidenciam que o melhor tamanho de explante para congelamento vai variar de espécie para espécie.

Para *C. mucugensis*, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos mais específicos de crioconservação de plantas, uma vez que o protocolo testado mostrou-se ineficiente, apesar de ter sido bem sucedido em outras espécies (RAY; BHATTACHARYA, 2008; SANTOS et al. 2015).

2. Conservação de sementes em diferentes ambientes

Como discutido anteriormente, o teor de umidade encontrado caracteriza as sementes de *C. mucugensis* como ortodoxas. Essa característica indica que as sementes apresentam naturalmente reduzido teor de água (SONG-QUAN et al. 2003; KERBAUY, 2004), o que facilita o processo de armazenamento em baixas temperaturas.

Ao longo de seis meses foi possível observar uma tendência à elevação taxa de germinação das sementes submetidas ao congelamento (- 20°C, - 80°C e -196°C) e uma redução na germinabilidade das sementes que não foram congeladas (temperatura ambiente e geladeira). Esses últimos resultados contrastam com o que foi encontrado por Nunes et al. (2008) para *C. elegans*,

cuja taxa de germinação aumentou à medida que o tempo de armazenamento aumentava, e Scalon et al. (2013) que constatou que a conservação das sementes de *Campomanesia adamantium* em geladeira não afeta a sua qualidade fisiológica.

A manutenção da germinabilidade de *C. mucugensis* em relação ao congelamento deve estar associada à característica ortodoxa dessas sementes. Segundo Chetverikova (2011) a maioria dos estudos com criopreservação de sementes não observou mudanças relevantes na taxa de germinação ao longo do tempo. O resultado desse estudo só reforça o encontrado para a preservação de sementes de espécies nativas que realizaram criopreservação como algumas cactáceas (BÁRBARA et al. 2015, MARCHI et al. 2013; VEIGA-BARBOSA et al. 2010), *Jatropha curcas* (PRADA et al. 2015), *Zephyranthes sylvatica* (SILVA et al., 2014); *Bixa orellana* (CORLETT, 2004), *Caesalpinia leiostachya* (LACERDA et al. 2002), *Apuleia leiocarpa* (SALOMÃO, 2002). NERY et al. (2011), observaram 100% de sobrevivência ao conservar eixos embrionários de *Anadenanthera colubrina* em nitrogênio líquido (-196 ° C), ultra freezer (-80 ° C) e freezer (-20 ° C) por 15, 30 e 150 dias.

Esses trabalhos, permitem inferir que o congelamento das sementes não é um problema e conseguir conservá-las por mais tempo em condições menos onerosas e mais acessíveis do que em nitrogênio líquido, além de reduzir os custos com a manutenção facilita o seu armazenamento.

O tempo médio de germinação foi maior nas sementes conservadas por 180 dias em todos os tratamentos (Tabela 4). Esse fato nos mostra que o tempo de armazenamento pode aumentar o tempo que as sementes levam para germinar. Em relação ao índice de velocidade de germinação (IVG) foi observado

que na maioria dos tratamentos não houve diferença significativa, sendo que apenas o T2 apresentou diferença estatística em relação aos diferentes períodos de armazenamento (Tabela 4). Esses resultados são similares aos encontrados por Duarte (2009) onde o IVG não apresentou diferença significativa. Em relação ao coeficiente de uniformidade de germinação (CUG), o T8 apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos, resultado que difere do encontrado para *P. pachycladus* (BÁRBARA et al. 2015) e *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* (MARCHI et al. 2013), pois não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos para a variável analisada.

Ao longo de 180 dias (Tabela 4) foi possível observar que houve uma elevação da taxa germinativa das sementes submetidas ao congelamento (T6, T7 e T8) quando comparadas com as sementes que não passaram por esse processo (T1, T2, T3, T4 e T5). No entanto, ainda se faz necessário a comparação entre esses locais de armazenamento por tempos maiores para inferir sobre as melhores condições de conservação das sementes de *C. mucugensis*.

3. Encapsulamento

Para *C. mucugensis* foi verificada que a melhor matriz para encapsulamento foi alginato de sódio (1%) diluído em meio MS/2 (Tabela 5) e o melhor explante foram plantas com 45 dias após a germinação, por apresentarem uma maior taxa de sobrevivência, plantas enraizadas e com vigor similar ao do controle (Figura 8 D-F). Possivelmente, o revestimento de alginato não interferiu no posterior desenvolvimento das plantas por exercer uma dupla função: protege o tecido juvenil da plântula no seu interior e simultaneamente

possibilita uma fácil ruptura durante o desenvolvimento da planta (GANTAIT et al. 2015).

Segundo Santos (2000) o encapsulamento-desidratação visando a criopreservação, necessita de um pré-cultivo do material encapsulado em solução saturada de sacarose seguida de desidratação em fluxo laminar antes do armazenamento em nitrogênio líquido. Para plantas de *C. mucugensis* a técnica de encapsulamento-desidratação não foi eficiente. Uma possível justificativa pode ser que tempo de pré-cultivo e de desidratação em fluxo laminar tenham sido insuficientes. O pré-cultivo ajuda a planta a tolerar a dessecação em temperaturas ultrabaixas e a sacarose tem sido o carboidrato frequentemente utilizado (WANG et al., 2005; PINKER et al., 2009; FENG et al. 2013; SOLIMAN, 2013; LI et al. 2014; SÁ et al. 2015), por isso foi escolhida para a pré-cultura no presente estudo. Entretanto, as cápsulas foram mantidas em solução saturada de sacarose por 24 horas, pois trabalhos encontraram efeitos positivos com esse período em pré-cultura (SANTOS et al. 2015, SÁ et al. 2015). Em contraste, há trabalhos que mantiveram as plantas nessas condições por períodos de um a sete dias e que encontraram entre o quarto e o quinto dias as melhores taxas de restabelecimento das plantas (LI et al. 2014, FENG et al. 2013).

Não há uma uniformidade em relação ao tempo de secagem das cápsulas em fluxo laminar, alguns autores obtiveram resultados satisfatórios ao realizar desidratação entre duas e nove horas (SOLIMAN, 2013; SÁ et al 2015; LOPES 2005; SARTOR et al. 2012, FENG et al. 2013; LI et al 2014; SÁ et al. 2015).

Para o encapsulamento de plantas de *C. mucugensis* a matriz e o explante a ser utilizado já foram estabelecidos. Entretanto, faz-se necessário experimentos adicionais sobre o pré-cultivo e tempo de desidratação, de forma a desenvolver um protocolo eficiente de encapsulamento-desidratação para a criopreservação de plantas de *C. mucugensis*.

CONCLUSÕES

As sementes de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* podem ser criopreservadas em nitrogênio líquido (-196°C) sem o comprometimento da sua qualidade fisiológica.

O congelamento das sementes em nitrogênio líquido, não compromete o desenvolvimento da planta após a germinação.

As soluções crioprotetoras utilizadas no presente trabalho não foram eficientes para a criopreservação de plantas de *C. mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*.

As capsulas com alginato de sódio (1%) diluído em meio MS e MS/2 armazenados em temperatura ambiente são eficientes no desenvolvimento da planta em meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- BÁRBARA, E. P. S. et al. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia - Edição Especial Cactaceae**, v. 9, n. 2, p. 91-96, 2015.
- BENSON, E. E. Cryopreservation of Phytodiversity: A Critical Appraisal of Theory & Practic. **Critical Reviews in Plant Sciences**. n. 27. p.141–219, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNPV/CLAV, p. 309, 315 e 316, 2009.
- CERQUEIRA, C. O. et al. Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 962-969, 2008.
- CHETVERIKOVA, E. P. Consequences of Plant Tissue Cryopreservation (Phenotype and Genome). **Biophysics**. v. 52, n. 2, p. 309–315, 2011.
- CIVATTI, L. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 38, p. 3847-3859, 2014.
- DUARTE, D. M. Qualidade fisiológica de sementes de sempre-viva *Syngonanthus spp* submetidas à crioconservação 2009. 52f. Dissertação de Mestrado - Universidade dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG. 2009.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243, 1991.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 40, n. 4, p. 427, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plantbiodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, p. 5-16, 2010.
- FENG, C. H. et al. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of *in vitro*-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulationdehydration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.112, p.369–378. 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GANTAIT, S. et al. Synthetic seed production of medicinal plants: a review on influence of explants, encapsulation agent and matrix. **Acta Physiologiae Plantarum** v. 37, n.5, p.98-2015.
- GIULIETTI, A. M. et al. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. **Rodriguésia**, v. 63, p. 001-019, 2012.

GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, p. 133-158, 1990.

GIULIETTI, A. M. et al. Estudos em "sempre-vivas": taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 329-377, 1996.

GIULIETTI, N. et al. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 1, p. 179-193, 1988.

GOLDFARB, M. et al. Cryogenic storage of seeds of physic nut (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas** v. 23, n. 1, p. 27-33, 2010.

GONZAGA, T. W. C. et al. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 5, n. 2, p. 145-154, 2003.

HEYWOODA, V. H.; IRIONDO, J. M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, v. 113, n. 3, p. 321-335, 2003.

LACERDA, S. N. B. et al. Estudo comparativo da crioarmazenagem de semente de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart.) com as técnicas convencionais de armazenagem. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2002.

LIMA-BRITO, A. et al. In vitro morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul: subsp. *mucugensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 502-510, 2011.

LIMA-BRITO, A. et al. Rustificação in vitro em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161r, 2016.

LOPES, K.P. Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste Brasileiro. 2005. 113f. Tese de Doutorado– Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, PB. 2005.

MARCHI, M. N. G. et al. Seed cryopreservation of the native cacti *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* from Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 21, p. 3250-3254, 2013.

MARTINELLE, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Centro nacional de conservação da flora. p.498. 2013.

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

NERY, F. C. et al. Cryopreservation of *Anadenanthera colubrina* (vell.) brenan embryonic axes Proc. First IS on Cryopreservation in Hort. Species Eds.: B. Panis and P. Lynch. **Acta Horticulturae** 908, p.227-232. 2011.

NUNES, S. C. P. et al. Época, local de colheita e armazenamento na qualidade fisiológica da semente de sempre-viva (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland – ERIOCAULACEAE) **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p.32-39, 2008.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, v. 9, p. 13-37, 1999.

PÊGO, R. G. et al. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência agrotecnologia.**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 32-39, , 2013.

PERULLO, N. et al. Seed cryopreservation and micropropagation of the critically endangered species swamp pink (*Helonias bullata* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, p. 284-293, 2015.

PINKER, I. et al. Effects of sucrose preculture on cryopreservation by droplet-vitrification of strawberry cultivars and morphological stability of cryopreserved plants. **CryoLetters** v.30, p. 202–211. 2009.

PRADA, J. A. et al. Cryopreservation of Seeds and Embryos of *Jatropha curcas* L. . **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 172-180, 2015.

RAY, A.; BHATTACHARYA, S. Cryopreservation of *in vitro* grown nodal segments of *Rauvolfia serpentina* by PVS2 vitrification. **Cryo Letters**. v. 29, n.4, p.321-8, 2008.

RAVEN, P.; HAVENS, K. *Ex situ* plant conservation and cryopreservation: breakthroughs in tropical plant conservation. **Int. J. Plant Sci.**, v. 175, n. 1, p. 1-2, 2014.

SÁ F. P. et al. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**. v.45 n.11 p. 1939-1945, 2015.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 12, p. 205-237, 2000.

SAKAI A.; ENGELMANN, F. vitrification, encapsulation–vitrification and droplet–vitrification: a review. **CryoLetters** v. 28, p. 151–172; 2007.

SAKAI, A. et al. Development of pvs-based vitrification and encapsulation–vitrification protocols. In: Reed B. M. (ed) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, Berlin, p. 33–58; 2008.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SANTOS P. A. A. et al. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for long-term storage. **Acta Scientiarum**. v. 37, n. 3, p. 289-296. 2015.

SARTOR, F.R. et al. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Agrotecnologia**, v.3, n.1, p.31-39, 2012.

SCALON, S.P.Q. et al. Conservation of *Campomanesia adamantium* (CAMB.) o. berg seeds in different packaging and at varied temperatures. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 262-269, 2013.

SILVA, M. W. D. et al. Characterization of seed germination of *Zephyranthes sylvatica* (Mart.) Baker (Amarilidacea). **Journal of Seed Science**, v. 36, p. 178-185, 2014.

SOLIMAN, H.I.A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apricot (*Prunus armeniaca* L.) using encapsulation dehydration. **African Journal of Biotechnology**, v.12, p.1419-1430, 2013.

SONG-QUAN, S. et al. Seeds recalcitrance: a current assessment. **Acta Botanica Sinica**, v. 45, n. 6, p. 638-646, 2003.

VEIGA-BARBOSA, L. et al. . Germination and cryopreservation of several cactus species from NE Brazil. **Seed Science and Technology**, v. 38, p. 218-224, 2010.

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

WANG, Q. C. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. **Plant Cell Reports**. v. 24, p. 280–288. 2005.

ANEXO

Tabelas de análise de variância

1. Efeito de 2,4-D e BAP na formação de calos

1.1 Sobrevivência

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP	4	59.282965	14.820741	1.017	0.4059
2,4-D	2	29.641483	14.820741	1.017	0.3678
BAP*2,4-D	7	118.565931	16.937990	1.162	0.3378
erro	61	889.244480	14.577778		
Total corrigido	74	1096.734859			
CV (%) =	3.84				
Média geral:	99.5554667	Número de observações:		75	

1.2 Brotação

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP	4	236.989632	59.247408	2.033	0.1009
2,4-D	2	88.871112	44.435556	1.525	0.2258
BAP*2,4-D	7	59.247408	8.463915	0.290	0.9552
erro	61	1777.422240	29.138070		
Total corrigido	74	2162.530392			
CV (%) =	607.33				
Média geral:	0.8888000	Número de observações:		75	

1.3 Oxidação

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP	4	7755.711133	1938.927783	2.079	0.0945
2,4-D	2	3688.768961	1844.384480	1.977	0.1472
BAP*2,4-D	7	7275.090442	1039.298635	1.114	0.3659
erro	61	56894.579130	932.698019		
Total corrigido	74	75614.149667			
CV (%) =	41.52				
Média geral:	73.5533333	Número de observações:		75	

1.4 Calogênese

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP	4	21835.336368	5458.834092	19.338	0.0000
2,4-D	2	1343.913400	671.956700	2.380	0.1011
BAP*2,4-D	7	5913.627560	844.803937	2.993	0.0091
erro	61	17219.378800	282.284898		
Total corrigido	74	46312.256128			
CV (%) =	121.96				
Média geral:	13.7764000	Número de observações:		75	

2. Efeito de BAP e Picloram na formação de calos

2.1 Sobrevivência

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP__M__	3	610.000000	203.333333	0.319	0.8116
PICLORAN__	3	1254.444444	418.148148	0.656	0.5812
BAP__M__*PICLORAN__	9	6290.317460	698.924162	1.097	0.3744
erro	80	50959.238095	636.990476		
Total corrigido	95	59114.000000			
CV (%) =	31.26				
Média geral:	80.7500000	Número de observações:		96	

2.2 Brotação

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP__M__	3	54.444444	18.148148	1.593	0.1975
PICLORAN__	3	90.000000	30.000000	2.634	0.0555
BAP__M__*PICLORAN__	9	170.317460	18.924162	1.661	0.1123
erro	80	911.238095	11.390476		
Total corrigido	95	1226.000000			
CV (%) =	450.00				
Média geral:	0.7500000	Número de observações:		96	

2.3 Oxidação

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP__M_	3	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
PICLORAN__	3	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
BAP__M_*PICLORAN__	9	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
erro	80	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000		
Total corrigido	95	0.000000			
CV (%) =	0.00				
Média geral:	100.0000000		Número de observações:	96	

2.4 Calogênese

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BAP__M_	3	414.444444	138.148148	1.752	0.1631
PICLORAN__	3	361.111111	120.370370	1.526	0.2140
BAP__M_*PICLORAN__	9	2445.873016	271.763668	3.446	0.0012
erro	80	6308.571429	78.857143		
Total corrigido	95	9530.000000			
CV (%) =	236.80				
Média geral:	3.7500000		Número de observações:	96	