

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**Marcelo Vielmo Afonso**

**TECNOLOGIA DE SEMENTES E PARÂMETROS  
MORFOFISIOLÓGICOS NA PROPAGAÇÃO DE *Tabernaemontana*  
*catharinensis* A. DC. (APOCYNACEAE)**

**Santa Maria, RS, Brasil.  
2016**

**Marcelo Vielmo Afonso**

**TECNOLOGIA DE SEMENTES E PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS NA  
PROPAGAÇÃO DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (APOCYNACEAE)**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Professora Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Almeri Tabaldi (UFSM)

Professora Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juçara Terezinha Paranhos (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AFONSO, MARCELO VIELMO  
TECNOLOGIA DE SEMENTES E PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS  
NA PROPAGAÇÃO DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.  
(APOCYNACEAE) / MARCELO VIELMO AFONSO.-2016.  
85 f.; 30cm

Orientadora: LUCIANE ALMERI TABALDI  
Coorientadora: JUÇARA TEREZINHA PARANHOS  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2016

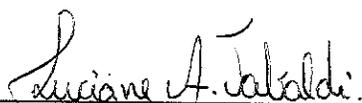
1. Cobrina 2. Planta Nativa 3. Sementes 4.  
Micropropagação 5. Substratos I. TABALDI, LUCIANE ALMERI  
II. PARANHOS, JUÇARA TEREZINHA III. Título.

**Marcelo Vielmo Afonso**

**TECNOLOGIA DE SEMENTES E PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS NA  
PROPAGAÇÃO DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (APOCYNACEAE)**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

**Aprovado em 03 de março de 2016:**



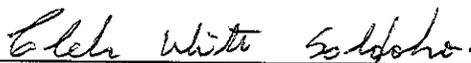
---

**Luciane Almeri Tabaldi, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Juçara Terezinha Paranhos, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Coorientadora)



---

**Cleber Witt Saldanha, Dr. (FEPAGRO)**



---

**Hilda Hildebrand Soriani, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

A concretização deste trabalho ocorreu, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de maneira especial agradeço:

A Deus por me dar forças para continuar e nunca desistir, mesmo frente a obstáculos que pareciam intransponíveis;

À minha mãe Carmem Divani, pelos valores e exemplo de mulher forte e determinada, essenciais para minha formação, e por sempre ter incentivado e apoiado meus estudos;

Às minhas orientadoras desta pesquisa, Dr<sup>a</sup>. Juçara Terezinha Paranhos e Dr<sup>a</sup>. Luciane Almeri Tabaldi, primeiramente pela confiança e oportunidade a mim concedidas, e por todos os ensinamentos, dedicação, incentivo, presença e orientação em todas as etapas desta pesquisa;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia pela minha formação acadêmica e oportunidades concedidas;

À minha companheira Caroline Hickenbick, por compreender minha ausência e sempre me apoiar e incentivar nas minhas escolhas tanto na minha vida pessoal e profissional;

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Simone Lucho, Denilso Santos, Carmen de Mattos, Marina Pissatto e Pâmela Aguirre por toda a ajuda e apoio na execução dos experimentos;

Aos meus colegas do PPG Agrobiologia, pela troca de conhecimento, pela união, parceria e amizade, em especial, aos meus amigos que levarei no meu coração para sempre Athos Dorneles e Aline Pereira pelo acolhimento nesses dois anos de caminhada durante o mestrado.

*“Por mais longa que seja a caminhada o  
mais importante é dar o primeiro passo”.*

*(Vinícius de Moraes)*

## RESUMO

### TECNOLOGIA DE SEMENTES E PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS NA PROPAGAÇÃO DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (APOCYNACEAE)

AUTOR: Marcelo Vielmo Afonso  
ORIENTADOR(a): Luciane Almeri Tabaldi  
COORIENTADOR(a): Juçara Terezinha Paranhos

*Tabernaemontana catharinensis*, conhecida popularmente como cobrina, é uma árvore nativa, pertencente à família Apocynaceae. Essa espécie é indicada para reflorestamento e rica em compostos fitoquímicos além de ser utilizada na medicina popular na forma de chá ou infusão de suas folhas e cascas. Impactos decorrentes da extração indiscriminada de sementes e partes vegetativas de espécies nativas vêm crescendo nos últimos anos, sendo um dos desafios para a produção o cultivo das plantas em larga escala de modo sustentável, sem o comprometimento dos recursos naturais. Contudo muitas espécies ainda carecem de informações ecológicas, fisiológicas e agrônômicas. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a qualidade fisiológica das sementes e os parâmetros morfofisiológicos de *T. catharinensis* propagadas *in vitro* e *ex vitro*. Para isso, frutos maduros foram coletados no terço médio lateral de cinco matrizes com cerca de quatro metros de altura e localizadas em remanescente vegetal, no município de Ijuí, região Noroeste do Rio Grande do Sul (28° 26' 07"S e 53° 57' 50"O). Os experimentos foram desenvolvidos em condições de laboratório e em casa de vegetação. Em laboratório, sementes foram colocadas para germinar na presença de luz (fotoperíodo de 16 horas) e ausência de luz (escuro contínuo), testando-se cinco temperaturas: 15, 20, 25, 30 °C e alternada 20-30 °C (noite-dia). Três condições e temperaturas de armazenamento: 25 ±1 °C (sala de crescimento), 10 ±1 °C (refrigerador) e 4 ±1 °C (câmara fria), constituíram o experimento para verificar o comportamento germinativo e o teor de água durante seis períodos de armazenamento das sementes (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias). Observou-se que, independente do regime de luz (fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo), temperaturas de 25 e 30 °C, promoveram maior percentagem de germinação das sementes de *T. catharinensis*. Sementes de *T. catharinensis* comportam-se como fotoblásticas neutras. O armazenamento das sementes de *T. catharinensis* por 180 dias reduz o teor de água das sementes, não ocorrendo redução no potencial germinativo, demonstrando um comportamento ortodoxo. Nos experimentos em condições *in vitro*, para obtenção de plântulas e estabelecimento de *T. catharinensis*, sementes foram pré-imersas em ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) nas concentrações de 0,0; 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> em dois regimes de tempo 24 e 48h. Posteriormente, segmentos cotiledonares de 1 cm de plântulas obtidas da germinação *in vitro*, com 70 dias de idade, foram inoculados em meio de cultura com 100% dos sais minerais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescidos das combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 mg L<sup>-1</sup> e ácido naftalenoacético (ANA) 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 mg L<sup>-1</sup>; para o experimento de enraizamento *in vitro*, microestacas de 90 dias, com três pares de folhas, foram inoculadas em MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido com concentrações de ácido indolbutírico (AIB) 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 mg

L<sup>1</sup>. A porcentagem de germinação não diferiu significativamente em sementes pré-imersas em GA<sub>3</sub>, contudo ocorreu redução na velocidade de germinação nas concentrações de 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> por 48h de imersão. No estabelecimento *in vitro*, ocorreu a organogênese direta de brotações adventícias de explantes cotiledonares de cobrina sem a necessidade de fitorreguladores de crescimento, porém o uso de BAP associado ao ANA maximizou o número de brotos, folhas e a massa fresca de brotações. Para o experimento de enraizamento *in vitro* a suplementação de 1,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB ao meio de cultura proporcionou maiores taxas de enraizamento (96,5 e 89%, respectivamente) e comprimento de raiz (15,96 e 15,60 cm, respectivamente). A ausência de fitorreguladores de crescimento (AIB) reduziu o número de pontas e volume de raízes e os teores de clorofila *b*. Para o experimento em casa de vegetação, os tratamentos constaram de composições do substrato Mecplant<sup>®</sup> (substrato comercial), vermiculita de textura fina (V) e casca de arroz carbonizada (CAC), avaliando-se a influência destes na emergência, vigor e nos parâmetros morfofisiológicos de *T. catharinensis*. Verificou-se que no uso isolado de substrato comercial 100% Mecplant<sup>®</sup> ocorreu menor emergência e IVG de plântulas, afetando negativamente as características de crescimento. O substrato comercial associado ao material inerte vermiculita nas formulações 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V e 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V propiciaram maior expressão do vigor de sementes e maior crescimento de mudas, evidenciando ser mais adequado, dentre os estudados, para a formação de mudas de cobrina. Teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides não são influenciados pelos substratos formulados. A relação da clorofila *a/b* é mais elevada nos tratamentos T2 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V), T4 (25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V) e T5 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC).

**Palavras-chave:** Cobrina. Fotoblásticas Neutras. Micropropagação. Segmentos Cotiledonares. Biomassa. Pigmentos Fotossintéticos.

## ABSTRACT

### SEED TECHNOLOGY AND MORPHOPHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN THE PROPAGATION OF *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (APOCYNACEAE)

Author: Marcelo Vielmo Afonso  
Advisor: Luciane Almeri Tabaldi  
Coadvisor: Juçara Terezinha Paranhos

*Tabernaemontana catharinensis*, popularly known as *cobrina*, is a native tree, which belongs to the family Apocynaceae. This species is suitable for reforestation, it is rich in phytochemicals compounds and it is used in folk medicine in the form of tea or infusion of its leaves and barks. Impacts of the indiscriminate extraction of seeds and vegetative parts of native species have increased in recent years, being the cultivation of plants on a large scale in a sustainable manner one of the challenges for production - without compromising natural resources. However many species still lack ecological, physiological and agronomic information. Then, the aims of this study were to evaluate the physiological quality of seeds and morphophysiological parameters of *T. catharinensis* propagated in vitro and ex vitro. In this regard, ripe fruits were collected in mid lateral third of five arrays with approximately four meters high and located in the remaining vegetation in the city of Ijuí, Northwest region of Rio Grande do Sul (28° 26' 07 "S and 53° 57' 50"W). The experiments were performed in laboratory and in greenhouse. In the laboratory, seeds were germinated in the presence of light (photoperiod of 16 hours) and in the absence of light (continuous dark), by testing five temperatures: 15, 20, 25, 30 °C and alternating 20 to 30 °C (night-day). Three conditions and storage temperatures: 25 ± 1 °C (growth room), 10 ± 1 °C (refrigerator) and 4 ± 1 °C (cold room), were part of the experiment. They were used to check the germination behavior and the water content during six periods seed storage (30, 60, 90, 120, 150 and 180 days). We observed that, regardless of photoperiod (photoperiod of 16 hours and continuous darkness), 25 and 30 °C temperatures promoted the highest percentage of germination of *T. catharinensis* seeds. *T. catharinensis* seeds behave as neutral photoblastic. The storage of seeds of *T. catharinensis* for 180 days reduces the water content of the seeds, not occurring the reduction in germination potential, which demonstrates an orthodox behavior. For the experiments in vitro conditions, in order to obtain seedlings and the establishment of *T. catharinensis*, seeds were pre-soaked in gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) at concentrations of 0.0; 300 and 600 mg L<sup>-1</sup> in two regimes of time 24 and 48 hours. Afterwards, the cotyledon segments of 1 cm seedlings obtained in vitro germination. With 70 days old, they were inoculated in culture medium with 100% of minerals MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), plus combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) 0.0; 1.0; 2.0; 4.0; 6.0 mg L<sup>-1</sup> and naphthaleneacetic acid (NAA) 0.0; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6 mg L<sup>-1</sup>. For in vitro rooting experiment, microcuttings of 90 days, with three pairs of leaves, were inoculated in MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962), supplemented with IBA concentrations 0.0; 1.0; 2.0; 4.0; 6.0 mg L<sup>-1</sup>. The percentage of germination was not significantly different in pre-soaked seeds in GA<sub>3</sub>, however we observed a reduction in the speed of germination at concentrations of 300 and 600 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> for 48h of immersion.

In vitro establishment, we verified the direct organogenesis of adventitious shoots from cotyledons of *cobrina* without the need for growth regulator, but the use of BAP associated with NAA maximized the number of shoots, leaves and fresh mass of shoots. For the in vitro experiment rooting supplementation of 1.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup> of IBA to the culture medium resulted in the highest rooting rate (96.5 and 89%, respectively) and root length (15.96 and 15.60 cm, respectively). The absence of growth regulators (IBA) decreased the number of tips and root volume and the contents of chlorophyll *b*. For the experiment in the greenhouse, the treatments were Mecplant<sup>®</sup> substrate compositions (commercial substrate), fine texture vermiculite (V) and carbonized rice husk (CRH), by evaluating their influence on the emergence, vigor and morphophysiological parameters of *T. catharinensis*. We found out that the isolated use of commercial substrate 100% Mecplant<sup>®</sup> occurred less emergency and IVG seedlings, which negatively affected the growth characteristics. The commercial substrate associated with inert material vermiculite in formulations 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V and 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V showed higher expression of seed vigor and greater seedling growth, proving to be more appropriate, from the study to the formation of *cobrina* seedlings. Levels of chlorophyll *b*, as well as the total carotenoid are not influenced by the substrates. The ratio of chlorophyll *a/b* is higher in the treatments T2 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V), T4 (25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V) and T5 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CRH).

**Keywords:** Cobrina. Neutral Photoblastic. Micropropagation. Cotyledon Segments. Biomass. Photosynthetic Pigments.

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO I – Qualidade fisiológica de sementes de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.: Efeito da temperatura, regime de luz e armazenamento**

FIGURA 1 - Teor de água (B.U %) das sementes de *Tabernaemontana catharinensis* ao longo do armazenamento em três condições distintas: sala de crescimento ( $25 \pm 1$  °C), geladeira ( $10 \pm 1$  °C) e câmara fria ( $4 \pm 1$  °C) .....30

### **CAPÍTULO II – Germinação de sementes e estabelecimento *in vitro* de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC**

FIGURA 1 – Percentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (B) de *Tabernaemontana catharinensis* em condições *in vitro*.....44

FIGURA 2 - Percentagem de regeneração de brotos de segmentos cotiledonares de *Tabernaemontana catharinensis*.....46

FIGURA 3 - Percentagem de enraizamento de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* em diferentes concentrações de AIB.....49

### **CAPÍTULO III – Emergência, vigor e desenvolvimento de plântulas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. em função do substrato**

FIGURA 1 - Percentagem de emergência (A) e Índice de velocidade de emergência (B) de plântulas de cobraína (*Tabernaemontana catharinensis*) em diferentes substratos.....66

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I – Qualidade fisiológica de sementes de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.: Efeito da temperatura, regime de luz e armazenamento**

TABELA 1 - Efeito das diferentes temperaturas e luminosidade na percentagem de germinação (G%) e no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *Tabernaemontana catharinensis*, por 60 dias .....25

TABELA 2 - Efeito das diferentes temperaturas e luminosidade na primeira contagem (%) em sementes de *Tabernaemontana catharinensis*.....27

TABELA 3 - Percentagem de germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Tabernaemontana catharinensis*, nas condições e intervalo de tempo de armazenamento.....28

TABELA 4 - Primeira contagem (%) de germinação de sementes de *Tabernaemontana catharinensis*, nas condições e intervalo de tempo de armazenamento.....31

### **CAPÍTULO II – Germinação de sementes e estabelecimento *in vitro* de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC**

TABELA 1 – Valores médios do número de brotos, comprimento de brotações, massa fresca dos brotos e número de folhas de explantes cotiledonares de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC aos 45 dias após a inoculação.....47

TABELA 2 - Valores de massa fresca ( $MF_{Raiz}$ ), comprimento ( $COM_{Raiz}$ ), área superficial ( $AS_{Raiz}$ ), volume ( $VOL_{Raiz}$ ) e número de pontas ( $N^{\circ}P$ ) de raízes de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., avaliadas aos 30 dias após a inoculação em concentrações de AIB.....51

TABELA 3 - Valores médios da clorofila *a* ( $Chl_a$ ), *b* ( $Chl_b$ ), total ( $Chl_{total}$ ), relação entre clorofila *a* e *b* ( $Chl\ a/b$ ) e carotenóides em folhas de microestacas de cobraína (*Tabernaemontana catharinensis* A. DC.) expostas à diferentes concentrações de AIB aos 30 dias após a inoculação. MF refere-se à matéria fresca.....52

### **CAPÍTULO III – Emergência, vigor e desenvolvimento de plântulas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. em função do substrato**

TABELA 1 - Altura (A), diâmetro do colo (DC), comprimento da maior raiz (CR) e área foliar (AF) de mudas de cobrina (*Tabernaemontana catharinensis* A. DC.) avaliadas aos 90 e 180 dias após a semeadura, cultivadas em diferentes substratos.....67

TABELA 2 - Massa seca da parte aérea ( $MS_{PA}$ ), massa seca da raiz ( $MS_{RAIZ}$ ), massa seca total ( $MS_{TOTAL}$ ), relação massa seca da raiz e parte aérea ( $MS_{RAIZ}/MS_{PA}$ ) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de cobrina (*Tabernaemontana catharinensis* A. DC.), aos 180 dias após a semeadura, cultivadas em diferentes substratos.....69

TABELA 3 - Valores médios da clorofila *a* (Chl*a*), *b* (Chl*b*), *total* (Chl*total*), relação entre clorofila *a* e *b* (Chl *a/b*) e carotenóides em mudas de cobrina (*Tabernaemontana catharinensis* A. DC.) aos 180 dias após semeadura, cultivadas em diferentes substratos. MF refere-se à matéria fresca.....71

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>1.2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I – Qualidade fisiológica de sementes de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC.: Efeito da temperatura, regime de luz e armazenamento</b> .....	18
	RESUMO .....	19
	ABSTRACT .....	20
	INTRODUÇÃO .....	21
	METODOLOGIA .....	22
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	32
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II – Germinação de sementes e estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC.</b> .....	37
	RESUMO .....	38
	ABSTRACT .....	39
	INTRODUÇÃO .....	40
	METODOLOGIA .....	41
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	53
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO III – Emergência, vigor e desenvolvimento de plântulas de <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC. em função do substrato</b> .....	59
	RESUMO .....	60
	ABSTRACT .....	61
	INTRODUÇÃO .....	62
	METODOLOGIA .....	63
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	73
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81
	<b>APÊNDICES</b> .....	83

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A grande diversidade genética da flora brasileira tem atraído à atenção de grandes empresas dos setores farmacêutico, de agronegócio, de química industrial e de cosméticos. Tal interesse é produto da acentuada valorização mundial do uso de plantas medicinais, a qual vem crescendo nas últimas décadas (MATOS, 2011). No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está atrelada às culturas indígena, negra e dos imigrantes europeus e representa uma valiosa fonte de metabólitos secundários para estudos (RAO; RAVISHANKAR, 2002). O conhecimento, ainda incipiente, sobre a maioria das espécies, associado à necessidade de preservação dessa biodiversidade, requer estudos ecológicos e fisiológicos básicos passíveis de serem utilizados em processos de conservação, preservação e reposição de plantas no ambiente natural.

*Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae), é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, sendo também encontrada na Argentina, Paraguai e Bolívia (PEREIRA et al., 2008). Planta pioneira medindo de 3 a 8 m de altura, popularmente conhecida como “cobrina”, “jasmim-cata-vento”, “leiteira de dois irmãos” e “casca de cobra” (QUINET; ANDREATA, 2005). As folhas são simples, opostas, com pecíolo de 1 a 12 mm de comprimento, e as inflorescências são terminais laxas, com 5-30 flores perfumadas de pétalas brancas que se abrem durante o dia. Possui frutos deiscentes, constituídos de dois mericarpos separados, com muitas sementes envoltas por arilo vermelho. Sua floração ocorre principalmente nos meses de outubro a novembro. Para a obtenção das sementes, os frutos devem ser colhidos diretamente da árvore quando iniciarem sua abertura espontânea, ocorrendo nos meses de maio e junho (LORENZI, 2009).

O chá ou a infusão das folhas e cascas são utilizados na medicina popular como antídoto para picadas de cobra, para aliviar dor de dente, tratamento de feridas, herpes, tumores e ainda, como hemostática, hipotensora, cardiotônica e também como vermífugo (PEREIRA et al., 2005). A espécie é rica em flavonoides, saponinas, terpenos, alcaloides e esteroides (CHI et al., 2005) sendo que os alcaloides e terpenos são classes fitoquímicas particularmente importantes quando se considera a atividade inseticida de compostos naturais (FERREIRA et al., 2001). Estudos fitoquímicos da espécie demonstraram que os ramos possuem atividade antioxidante maior do que os frutos, revelando além da rutina, um glicosídeo de

quercetina e ácido clorogênico, ambos reconhecidos como ativos antioxidantes (PIANA et al., 2014). A espécie possui também um imenso potencial ornamental, sendo indicada para reflorestamentos mistos destinados à recuperação de mata nativa (SOBRAL et al., 2006).

As fortes pressões antrópicas e os impactos decorrentes da extração indiscriminada de sementes e partes vegetativas de espécies nativas vêm crescendo nos últimos anos, sendo um dos desafios para a produção, o cultivo das plantas em larga escala de modo sustentável, sem o comprometimento dos recursos naturais (MORANDI, 2009). Contudo muitas espécies ainda carecem de informações básicas referentes às condições ideais de armazenamento das sementes e sua posterior viabilidade, efeito da temperatura, luz e substrato sobre a germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas, obtenção de plantas com menor heterogeneidade e a variabilidade química em espécies vegetais de interesse medicinal (FONSECA et al., 2006).

A conservação das sementes é de fundamental importância, uma vez que tem a função básica de manter a qualidade física, fisiológica e sanitária, preservando sua viabilidade para obtenção de plantas saudáveis (SCHUMACHER et al., 2002). Quanto à sensibilidade das sementes à luz, que é variável de acordo com a espécie, há sementes cuja germinação é influenciada positiva ou negativamente pela luz e sementes indiferentes a esse fator, denominadas fotoblásticas positiva, negativa e neutra, respectivamente (GUEDES et al., 2010).

A faixa de temperaturas mínima, ótima e máxima para a germinação de sementes das espécies é um fator importante, pois a temperatura ótima propicia a máxima percentagem de germinação em menor espaço de tempo, enquanto em temperaturas máximas e mínimas, as sementes perdem tal capacidade (PEREIRA et al., 2013). A temperatura influencia a velocidade de absorção de água, assim como as reações bioquímicas que determinam todo o processo de germinação e, conseqüentemente a velocidade de germinação, podendo estar relacionada com a qualidade do substrato (TONIN; PEREZ, 2006).

Além da temperatura e da luz, a composição do substrato também desempenha papel importante na germinação e no sucesso do crescimento da planta. Segundo Carvalho Filho et al. (2002), o substrato exerce influência no sistema radicular e no estado nutricional das plantas. Além disso, a estrutura do substrato irá influenciar a qualidade de aeração, a capacidade de retenção de água

e do seu grau de infestação por patógenos, e conseqüentemente o sucesso ou insucesso na germinação das sementes e no desenvolvimento das plantas.

A propagação *in vitro* gera um ambiente homogêneo e estável, possibilitando a seleção de plantas com alta qualidade sanitária, auxiliando no melhoramento genético (BOTREL, 2012). Dentre as alternativas *in vitro* as técnicas de micropropagação tem sido considerada uma ferramenta eficaz e promissora na obtenção de plantas em larga escala de interesse medicinal, aromático e agrônômico, tendo como perspectiva a obtenção de germoplasma competitivo, tornando assim necessário o estabelecimento de meios de cultivos que tornem o processo de micropropagação mais eficiente (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

O sucesso da micropropagação depende de muitos fatores, principalmente da espécie, do meio de cultura, do balanço hormonal e do tipo de explante, os quais influenciam diretamente as respostas morfogênicas *in vitro* (KHAWAR et al., 2004). A composição e a concentração dos fitorreguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes para o crescimento e para o padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de micropropagação das plantas (CALDAS et al., 1998). De maneira geral, as auxinas estão relacionadas com a indução da rizogênese enquanto que, as citocininas induzem a formação de múltiplos brotos. Portanto, o balanço entre estes dois fitorreguladores vegetais poderá possibilitar um maior número de microplantas completas (PINHAL et al., 2011).

## 1.2 OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

Analisar a germinação de sementes em diferentes condições e propagar *in vitro* e *ex vitro* *Tabernaemontana catharinensis*.

### **Objetivos específicos**

- Estudar o efeito de diferentes temperaturas e regime de luz na germinação das sementes de *T. catharinensis*;
- Analisar o melhor ambiente (temperatura) de armazenamento das sementes dentro de períodos estabelecidos;

- Obter plantas completas de cultivo *in vitro*, a partir de explantes retirados de plântulas oriundas da germinação *in vitro* de sementes;
- Avaliar a influência do AIB no enraizamento *in vitro* de microestacas de *T. catharinensis*;
- Verificar a composição de substrato mais adequada para a germinação de sementes e crescimento de plântulas de *T. catharinensis*;

### **Divisão do trabalho em capítulos:**

Os objetivos foram alcançados através do desenvolvimento de três experimentos, os quais estão apresentados na forma de capítulos, como segue:

**Capítulo I:** Qualidade fisiológica de sementes de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.: Efeito da temperatura, regime de luz e armazenamento

**Capítulo II:** Germinação de sementes e estabelecimento *in vitro* de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC

**Capítulo III:** Emergência, vigor e desenvolvimento de plântulas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. em função do substrato

### **3 CAPÍTULO I**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Tabernaemontana catharinensis*  
A. DC.: EFEITO DA TEMPERATURA, REGIME DE LUZ E ARMAZENAMENTO**

## QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.: EFEITO DA TEMPERATURA, REGIME DE LUZ E ARMAZENAMENTO

### RESUMO

*Tabernaemontana catharinensis* é uma espécie arbórea nativa do Rio Grande do Sul e utilizada para reflorestamentos mistos destinados à recuperação de mata nativa, sendo propagada preferencialmente por sementes, a qual é influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos. O trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura, regimes de luz, períodos e condições de armazenamento das sementes na germinação da espécie. Após a assepsia, as sementes foram colocadas para germinar em caixas de polietileno tipo *gerbox*, sobre papel filtro constituindo dois experimentos. No experimento I foram testadas duas condições de luminosidade: presença (fotoperíodo de 16 horas) e ausência de luz (escuro contínuo), e cinco temperaturas (15, 20, 25, 30 °C e alternada 20-30 °C). Para o experimento II o armazenamento das sementes foi realizado em três condições: 25 ±1 °C (sala de crescimento), 10 ±1 °C (refrigerador) e 4 ±1 °C (câmara fria) e seis períodos de armazenamento (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias), em cada período foi determinado o teor de água. Ambos os experimentos foram utilizados delineamento experimental inteiramente casualizado, com 100 sementes por tratamento, quatro repetições cada, determinando-se a percentagem de germinação, a primeira contagem e o índice de velocidade de germinação (IVG). As maiores percentagens de germinação ocorreram nas temperaturas de 25 e 30 °C, independente do regime de luz, variando de 83 a 89%. Na ausência de luz foram observadas as maiores médias de IVG. Houve redução no teor de água das sementes nas condições e períodos de armazenamento, não ocorrendo redução no potencial germinativo, demonstrando um comportamento ortodoxo. As três condições de armazenamento são eficientes para manter a viabilidade de sementes de *T. catharinensis* por 180 dias.

**Palavras-chave:** Cobrina. Planta Nativa. Fotoblásticas Neutras. Sementes Ortodoxas.

## PHYSIOLOGICAL QUALITY OF SEEDS OF *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.: THE EFFECT OF TEMPERATURE, LIGHT REGIME AND STORAGE

### ABSTRACT

*Tabernaemontana catharinensis* is a tree species native to Rio Grande do Sul and it is used for mixed reforestation for the recovery of native forest, being preferably propagated by seed, which is influenced by a number of biotic and abiotic factors. The work was carried out in order to evaluate the effect of temperature, light regimes, periods and seed storage conditions on germination of the species. After asepsis, the seeds were germinated in polyethylene gerbox boxes on filter paper constituting two experiments. In the first experiment, two lighting conditions were tested: presence (photoperiod of 16 hours) and absence of light (continuous dark) and five temperatures (15, 20, 25, 30 °C and alternating 20 to 30 °C). For the experiment II, the seed storage was carried out under three conditions:  $25 \pm 1$  °C (growth room),  $10 \pm 1$  °C (refrigerator) and  $4 \pm 1$  °C (cold room) and six storage periods (30, 60, 90, 120, 150 and 180 days) and, in each period, we determined the water content. For both experiments, we used completely randomized design, with 100 seeds per treatment, four replicates each, determining the percentage of germination, the first count and germination speed index (GSI). The highest percentage of germination occurred at temperatures of 25 and 30 °C, regardless of light regime, ranging from 83 to 89%. In the absence of light, we observed the highest mean of GSI. We could also observed a reduction in water content of the seeds in conditions and storage periods, not leading to a reduction in the germination potential, which may demonstrate an orthodox behavior. The three storage conditions are effective to keep up the viability of seeds of *T. catharinensis* during 180 days.

**Keywords:** Cobrina. Native Plant. Neutral Photoblastic. Orthodox Seeds.

## INTRODUÇÃO

O comportamento germinativo das sementes arbóreas varia em função de fatores como temperatura, luz, condições e período de armazenamento, dentre outros. O estudo da influência destes fatores pode fornecer informações de interesse biológico, ecológico e da tecnologia de sementes, pois ainda existe uma lacuna com relação ao conhecimento das exigências de espécies lenhosas nativas que têm a semente como principal meio de propagação (GALINDO et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2012). Tal conhecimento pode auxiliar na manutenção e conservação de determinada espécie que se almeja domesticar (NETO et al., 2008).

A adequação das espécies ao ambiente de ocorrência se dá através do reflexo aos fatores bióticos e abióticos, ocorrendo uma variabilidade nas respostas, sendo essencial entender este mecanismo para o sucesso do estabelecimento das espécies em seu habitat natural (STEFANELLO et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2012). A temperatura, como fator abiótico influencia a absorção de água e as reações metabólicas, onde em uma faixa ótima de temperatura o processo germinativo se realiza mais rápido e eficientemente, sendo dependente da espécie e da região de origem (MACHADO et al., 2002).

Além da temperatura a luz pode ser um fator considerado importante na germinação das sementes. No processo germinativo tem sido demonstrado diversidade de respostas à luminosidade entre as espécies, pois a luz é necessária para a germinação de espécies denominadas fotoblásticas positivas, enquanto as fotoblásticas negativas germinam na ausência de luz, existindo ainda as indiferentes, que não apresentam sensibilidade à luz (NETO et al., 2008). Nas espécies fotoblásticas positivas, a exigência de luz para germinar está diretamente ligada a existência de uma cromoproteína denominada fitocromo, que tem a função de captar luz para dar início ao processo germinativo das sementes (TAIZ; ZEIGER, 2009). A temperatura e a luz são fatores primordiais no sucesso da germinação, contudo a viabilidade das sementes e a possibilidade de obtenção de plântulas em diferentes períodos estão diretamente dependentes do seu estado de conservação.

Nesse sentido, o armazenamento tem papel importante no processo produtivo e, quando bem conduzido, minimiza a deterioração e o descarte de lotes de sementes (ZONTA et al., 2014). No entanto, ainda falta conhecimento em relação a classificação das sementes quanto ao potencial de armazenamento, principalmente

das espécies arbóreas, devido ao comportamento diferenciado de cada espécie, as sementes podem ser classificadas em grupos distintos como: ortodoxas que se mantêm viáveis após a secagem até o teor de água de até 5%, as recalcitrantes que perdem rapidamente a viabilidade se forem secadas a teores de água muito baixos e as recalcitrante que apresentam comportamento intermediário entre os citados, tolerando a dessecação entre 7 e 10% de teor de água (ROBERTS, 1973; CARVALHO et al., 2006). O processo de armazenamento ainda, é influenciado pelas condições fisiológicas iniciais das sementes, danos físicos, condições do armazenamento (grau de umidade e temperatura), tipo e a incidência de patógenos e pela atuação conjunta desses fatores, podendo proporcionar diferenças de comportamento entre lotes de sementes armazenadas (PEREIRA, 1994; NETO et al., 2014).

Apesar da maioria das espécies arbóreas propagarem-se por sementes, existem poucas informações quanto ao potencial germinativo das sementes de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). Trata-se de uma espécie nativa do Rio Grande do Sul (PEREIRA et al., 2008) sendo uma planta pioneira, medindo de 3 a 8 m de altura, popularmente conhecida como “cobrina” (QUINET; ANDREATA, 2005), e indicada para reflorestamentos mistos destinados à recuperação de mata nativa (SOBRAL et al., 2006).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da temperatura, regimes de luz, e condições de armazenamento na germinação de sementes de *T. catharinensis*.

## **METODOLOGIA**

Os frutos da espécie *T. catharinensis* foram coletados no terço médio lateral de cinco matrizes com cerca de quatro metros de altura e localizadas em remanescente vegetal, no município de Ijuí, região Noroeste do Rio Grande do Sul (28° 26' 07"S e 53° 57' 50"O), nos meses de maio de 2014 e 2015. As sementes foram removidas de forma manual, lavadas em água corrente com auxílio de peneira e submetidas ao processo de secagem natural sobre bandeja com fundo de tela por cinco dias, para constituição dos experimentos no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A desinfestação das sementes, nos dois experimentos, foi realizada em câmara de fluxo laminar, utilizando-se etanol 70% por 30 segundos, seguida de solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 15 minutos e após triplo enxágue em água destilada e esterilizada em autoclave, sendo então imersas em fungicida comercial Maxim<sup>®</sup> (Fludioxonil) na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> por 5 minutos. Após a assepsia, as sementes foram inoculadas em caixas acrílicas transparentes *gerbox* (11 x 11 x 3,5 cm), desinfestadas com etanol a 70%, sobre duas folhas de papel filtro previamente autoclavadas e posterior embebição em 10 mL de água esterilizada. Após a inoculação das sementes, as caixas foram fechadas com tampa do mesmo material e mantidas em câmara BOD.

Experimento I: foi constituído por sementes coletadas em 2014 e após o processo de secagem natural e posterior desinfestação foram dispostas para germinar sob presença de luz (fotoperíodo de 16 horas - irradiância de 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e ausência de luz (escuro contínuo), em cinco temperaturas: 15, 20, 25, 30 °C e alternada 20-30 °C (noite-dia), em um esquema bifatorial (2 x 5).

Experimento II: sementes coletadas em 2015 foram separadas em três lotes, acondicionadas em sacos de papel pardo e armazenadas em três condições e temperaturas de armazenamento: 25  $\pm$ 1 °C (sala de crescimento), 10  $\pm$ 1 °C (refrigerador) e 4  $\pm$ 1 °C (câmara fria). O controle constituiu-se de sementes colocadas para germinar no tempo zero (após coleta dos frutos e secagem das sementes por cinco dias). As sementes armazenadas foram inoculadas em intervalos de 30 dias por um período de 180 dias, constituindo um esquema bifatorial (3 x 6) na temperatura e regime de luz (30 °C e fotoperíodo de 16 horas, respectivamente).

Em cada lote de sementes foi retirada uma amostra para determinação do teor de umidade inicial das sementes no tempo zero e a cada intervalo do teste de germinação. Para essa determinação foi utilizado o método oficial de estufa a 105  $\pm$ 3 °C durante 24 horas, descrito nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O teor de água, em base úmida, foi estabelecido como sendo a média de três repetições e os resultados calculados utilizando-se a equação:  $B.U\% = (M_i - M_f) / (M_i - T) \times 100$  onde:  $M_i$  = massa inicial da amostra (gramas);  $M_f$  = massa final da amostra (gramas);  $T$  = massa do recipiente (gramas); B.U% = teor de água em percentagem de base úmida.

Nos dois experimentos foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes cada, totalizando 100 sementes por tratamento em delineamento experimental inteiramente casualizado. A cada três dias após a inoculação das sementes foram realizadas as avaliações, sendo consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram protrusão de 0,3 cm da radícula, determinando-se a percentagem de germinação (%G) conforme Labouriau e Valadares (1976), utilizando-se a fórmula  $G = (N/A) \times 100$  onde, N é o total de sementes germinadas e A é o número total de sementes colocadas para germinar. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado utilizando a fórmula descrita por Maguire (1962), que é obtido pelo somatório da razão entre o número de sementes germinadas a cada dia sobre o dia da avaliação, conforme a fórmula:  $IVG = G1/N1 + G2/N2 + G3/N3 + \dots + Gn/Nn$ , onde: G1, G2, G3, ..., Gn é o número de sementes germinadas no dia da observação e N1, N2, N3, ..., Nn é o número de dias após a semeadura. Em ambos os experimentos, foi determinada também a primeira contagem de germinação (%), conduzida juntamente com o teste de germinação, cuja avaliação foi realizada aos 15 dias após a semeadura.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro, utilizando o aplicativo Sisvar (FERREIRA, 2008).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Experimento I:**

A germinação das sementes de *T. catharinensis* foi influenciada pelas temperaturas e regimes de luz, observando-se interação significativa entre ambos. Com exceção das temperaturas de 20 °C e alternada 20-30 °C, onde sementes germinadas no escuro apresentaram maior percentagem de germinação comparado com as sementes germinadas na presença de luz, nas demais não houve diferença estatística entre as percentagens de germinação das sementes nos dois regimes de luz (Tabela 1). Sementes mantidas no escuro contínuo nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C apresentaram maior percentagem de germinação comparadas com as demais temperaturas (15 °C e alternada 20-30 °C), variando de 85 a 87%. Sementes que permaneceram na luz e em temperatura de 25 e 30 °C apresentaram percentagem de 83 e 89%, respectivamente, diferindo da temperatura de 20 °C (70%). Na

temperatura de 15 °C não houve germinação das sementes, tanto na presença como na ausência de luz (Tabela 1).

Embora as espécies apresentem comportamento variável quanto à temperatura de germinação, a faixa de 20 a 30 °C é considerada ótima para a maioria das espécies tropicais e subtropicais iniciarem o processo de germinação (BORGHETTI, 2005), pois estas temperaturas influenciam favoravelmente a absorção de água e as reações bioquímicas, regulando o metabolismo necessário para iniciar o crescimento do embrião, e conseqüentemente atuando sobre a velocidade, a uniformidade e a germinação total das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; DOUSSEAU et al., 2008).

Tabela 1 – Efeito das diferentes temperaturas e luminosidade na percentagem de germinação (G%) e no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *Tabernaemontana catharinensis*, por 60 dias.

Temperatura (°C)	G (%)		IVG	
	Luz	Escuro	Luz	Escuro
15	0,0 Ad*	0,0 Ac	0,0 Ac	0,0 Ac
20	70,0 Bb	87,0 Aa	0,52 Bb	0,70 Ab
25	83,0 Aa	85,0 Aa	0,75 Aa	0,84 Aa
30	89,0 Aa	86,0 Aa	0,91 Aa	0,94 Aa
20-30	48,0 Bc	64,0 Ab	0,44 Ab	0,57 Ab

\*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre presença ou ausência de luz dentro da mesma temperatura. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas de germinação dentro dos tratamentos na presença ou ausência de luz, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

A temperatura mínima, ponto crítico onde não ocorre germinação (OLIVEIRA; GARCIA, 2005), tem a fluidez da água e os processos metabólicos afetados, sendo que a diminuição da temperatura torna a água menos fluida, diminuindo o seu movimento do meio para as sementes (NOGGLE; FITES, 2010). Na temperatura alternada (20-30 °C) ocorreu uma redução significativa na germinação de sementes de *T. catharinensis* nos dois regimes de luz (Tabela 1). Resultados similares foram relatados por Brasil (2013) em *Carica papaya* (mamoeiro) e *Handroanthus*

*serratifolius* (ipê amarelo), nas temperaturas alternadas (20-30 °C) e (20-35 °C), respectivamente. Faixas de temperaturas que restringem ou causam oscilação da germinação estão diretamente ligadas à redução do vigor, podendo influenciar em maior tempo de estabelecimento de plântulas a campo.

As sementes de *T. catharinensis* germinaram nas duas condições de luz (presença/ausência), podendo ser consideradas fotoblásticas neutras ou indiferentes à luz (SANTOS et al., 2005). Resultados semelhantes foram observados para desencadear o processo germinativo em sementes de *Luetzelburgia auriculata* (NOGUEIRA et al., 2012) e *Caesalpinia peltophoroides* (FERRAZ-GRANDE; TAKAKI, 2006), havendo germinação em ambas as condições indicando ausência de fotosensibilidade. Em *T. catharinensis*, o fato das sementes germinarem em ampla faixa de temperatura, na luz e no escuro, pode ser uma indicação que a espécie não mantém um permanente banco de sementes no solo e as mesmas germinem assim que níveis adequados de umidade, de temperatura e de oxigênio sejam alcançados (NOGUEIRA, et al. 2012).

Em geral, as temperaturas de 25 e 30 °C promoveram aumento do IVG, diferindo estatisticamente das demais temperaturas. No comparativo entre ausência e presença de luz, houve maior velocidade de germinação na ausência de luz na temperatura de 20 °C e na temperatura alternada 20-30 °C (Tabela 1). Entre as temperaturas, as sementes germinadas a 25 e 30 °C apresentaram maior IVG tanto na ausência quanto na presença de luz. Temperaturas mais baixas provocam atraso na germinação e no crescimento, devido à redução da atividade das enzimas envolvidas na respiração e no metabolismo, afetando os processos de divisão e alongamento celular e dificultando a mobilização das reservas indispensáveis para o processo germinativo e, conseqüentemente, o índice de velocidade de emergência das sementes (MARCOS FILHO, 2005; MORTELE et al., 2008). Isto explica o fato das sementes submetidas às temperaturas de 15 °C, 20 °C e 20 – 30 °C levarem mais tempo para germinar.

As sementes de *T. catharinensis* iniciaram a germinação aos 15 dias após a inoculação (primeira contagem). A temperatura ótima na qual as sementes expressaram potencial máximo de germinação influenciou a primeira contagem; temperatura constante de 30 °C na ausência de luz conferiu desempenho superior (11%), seguida de 8,0% na presença de luz e mesma temperatura (Tabela 2). Em 25 °C e escuro contínuo, houve diferença significativa, em relação a presença de luz

(7,0% e 0,0% respectivamente). Nas temperaturas de 15, 20 e 20-30 °C, ocorreu baixa germinação (abaixo de 2%) na primeira contagem. Além disso, não houve diferença significativa entre a presença ou ausência de luz dentro de cada temperatura avaliada.

Tabela 2 – Efeito das diferentes temperaturas e luminosidade na primeira contagem (%) em sementes de *Tabernaemontana catharinensis*.

	LUMINOSIDADE	TEMPERATURA				
		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20-30 °C
1 <sup>o</sup> Contagem (15 dias)	LUZ	0,0 Ab	0,0 Ab	0,0 Ab	8,0 Aa	2,0 Ab
	ESCURO	0,0 Ab	1,0 Ab	7,0 Aa	11,0 Aa	1,0 Ab

\*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre presença ou ausência de luz dentro da mesma temperatura. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas de germinação dentro dos tratamentos na presença ou ausência de luz, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade

A rapidez e uniformidade da germinação são características desejáveis, pois quanto mais tempo a semente permanece no processo inicial de embebição até culminar no crescimento do eixo embrionário fica mais sujeita às condições adversas do ambiente, inclusive suscetível ao ataque de fungos (BOTELHO et al., 2008). É sabido que alto vigor e elevada germinação são dois pré-requisitos para se alcançar um estabelecimento adequado de plântulas. O vigor de sementes é definido como "aquelas propriedades das sementes que determinam o potencial para uma germinação rápida e uniforme e o desenvolvimento de plântulas normais sob diferentes condições de campo" (MCDONALD, 1980 apud NASCIMENTO et al., 2007).

### Experimento II:

As três condições de armazenamento não influenciaram significativamente a percentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação quando comparadas as médias das três condições de armazenamento, mantendo-se próximas do controle no tempo zero, 88% e 1,11 para a germinação e o IVG, respectivamente (dados não demonstrados), ocorrendo diferença significativa entre os lotes no tempo de armazenamento somente na condição de armazenamento a 10 ±1 °C (Tabela 3), onde a percentagem de germinação foi maior em 60 e 150 dias de armazenamento e o IVG foi maior aos 150 dias de armazenamento.

As diferenças de percentagem da germinação e IVG encontradas na mesma condição de armazenamento referem-se, provavelmente, à um menor grau de deterioração de um maior número de sementes na fase inicial de coleta mantendo esta conservação durante o armazenamento a que foram submetidas, evitando mudanças degenerativas de origem bioquímica, fisiológica e física, que estão ligadas à redução de vigor das sementes (ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972; OLIVEIRA et al., 2005). Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), dependendo da qualidade do lote, as sementes apresentam comportamentos germinativos diferentes durante o armazenamento.

Tabela 3 – Percentagem de germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Tabernaemontana catharinensis*, nas condições e intervalo de tempo de armazenamento.

	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO EM DIAS						
		30	60	90	120	150	180	MÉDIA
G(%)	25 ±1 °C	83,0 a*	86,0 a	76,0 a	81,0 a	85,0 a	82,0 a	82,2 A
	10 ±1 °C	82,0 b	88,0 a	78,0 b	82,0 b	92,0 a	84,0 b	84,3 A
	4 ±1 °C	80,0 a	92,0 a	78,0 a	91,0 a	90,0 a	86,0 a	86,2 A
IVG	25 ±1 °C	1,02 a	1,08 a	1,04 a	1,00 a	1,22 a	1,07 a	1,07 A
	10 ±1 °C	1,07 b	1,12 b	0,93 b	1,02 b	1,32 a	1,09 b	1,09 A
	4 ±1 °C	1,08 a	1,13 a	1,06 a	1,12 a	1,25 a	1,13 a	1,13 A

\*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias das condições de armazenamento. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tempo de armazenamento em cada condição de armazenagem, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

Segundo a classificação das sementes quanto a dessecação, estas podem ser classificadas em ortodoxas quando suportam dessecação sem perder a viabilidade, podendo ser desidratadas até baixos graus de umidade (5% de seu teor de água) e armazenadas em baixas temperaturas por longos períodos. Em relação às sementes recalcitrantes, estas não suportam redução do teor inicial de água abaixo de 30%, perdendo sua viabilidade quando isto ocorre; e ainda há as sementes que apresentam comportamento intermediário entre os citados, tolerando a dessecação entre 7 e 10% de teor de água, mas não toleram baixas temperaturas

durante períodos de tempo prolongado, característica de várias espécies florestais (ROBERTS, 1973; CARVALHO et al., 2006).

As sementes de *T. catharinensis* apresentaram comportamento ortodoxo, o qual pode ser originado de mecanismos de escape de destruição celular durante a perda de água. Quando células não tolerantes à dessecação são desidratadas, algumas consequências são observadas: concentração de solutos, aumentando as reações químicas destrutivas; cristalização de solutos, modificando a resistência iônica e o pH da solução intracelular, iniciando a desnaturação das proteínas e a ruptura das membranas celulares (BARBEDO; BILIA, 1998). Esse comportamento ortodoxo é altamente desejável, devido ao fato das espécies florestais apresentarem, em geral, uma produção irregular de sementes, sendo abundante em um ano e escassa em outros (AGUIAR, 1995). Por essa razão, depois de colhidas e até serem utilizadas para semeadura, as sementes devem ser armazenadas de maneira a atrasar ao máximo o processo de deterioração (BORBA FILHO et al., 2009).

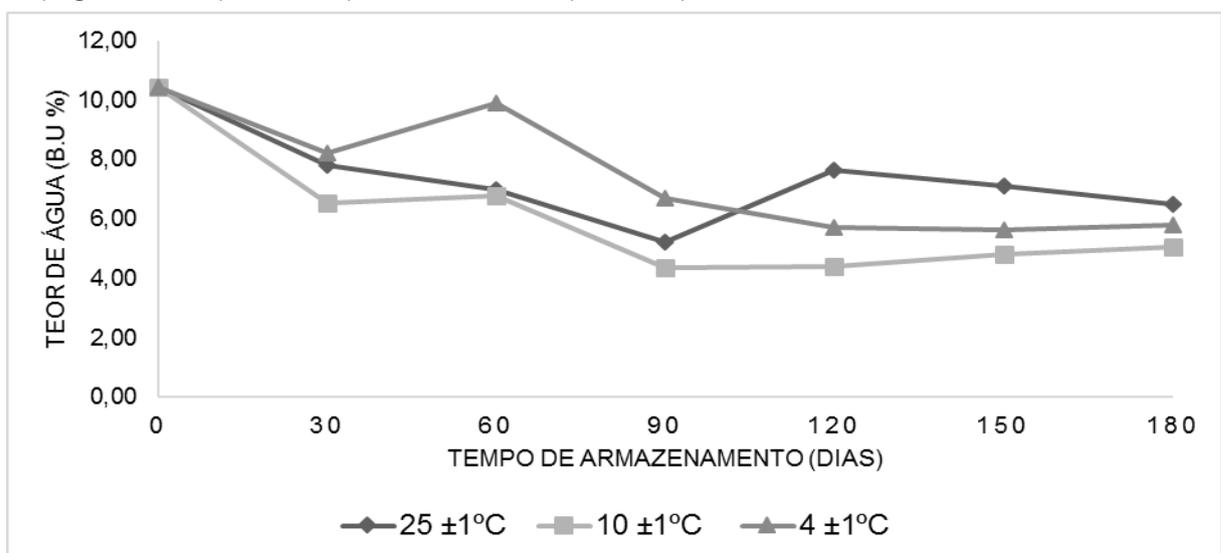
Nesse sentido, as condições de armazenamento são os fatores mais importantes para a conservação da viabilidade das sementes, especificamente a temperatura e a umidade. Para sementes ortodoxas, as melhores condições para a manutenção da qualidade são a baixa umidade relativa do ar e a baixa temperatura, por reduzirem a atividade metabólica do embrião e, conseqüentemente, a deterioração (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005). Diferenças não observadas na condição de armazenamento em sala de crescimento ( $25 \pm 1$  °C), demonstrando alta percentagem de germinação pode estar relacionada ao tegumento. Este tipo de armazenamento pode ser utilizado para sementes de tegumento duro característico das sementes de *T. catharinensis*, desde que esta forma de armazenamento não seja realizada por períodos muito prolongados (SCHUMACHER et al., 2002; HONG; ELLIS, 2003).

Adicionalmente, uma boa taxa de germinação correlacionada com um bom IVG requer sementes com alta qualidade inicial, e métodos para a manutenção desta qualidade fisiológica pelo maior tempo possível (HONG; ELLIS, 2003). A redução na qualidade é, em geral, traduzida pelo decréscimo na percentagem de germinação, aumento de plântulas anormais e redução no vigor das plântulas (TOLEDO et al., 2009). Dentre os fatores que afetam a qualidade durante o armazenamento estão a temperatura e o teor de água da semente.

As sementes de *T. catharinensis* no tempo zero demonstraram um teor de água (B.U %) de 10,44 (Figura 1), decrescendo até 180 dias de armazenamento, nas três condições. Maior redução de água foi observada nas sementes armazenadas na temperatura de 10 °C (refrigerador), observando-se B.U % de 5,04, seguida da condição de câmara fria (4 °C) B.U % 5,79 e sala de crescimento (25 °C) B.U % 6,48 para os 180 dias de armazenamento. A manutenção do grau de umidade das sementes foi melhor no armazenamento em refrigerador e câmara fria. Esses ambientes possuem temperatura e umidade relativa inferiores ao ambiente sala de crescimento (25 °C), ocasionando perda de água da semente para o ambiente (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

O teor de água é o fator de maior significância na prevenção da deterioração das sementes durante o armazenamento. Mantendo-se baixo o teor de água e a temperatura das mesmas, o ataque de microrganismos e a respiração terão seus efeitos minimizados (BERBERT et al., 2008). Conforme Silva et al. (2008) há um incremento na taxa respiratória proporcional ao aumento da temperatura, que fica na dependência do teor de água das sementes.

Figura 1: Teor de água (B.U %) das sementes de *Tabernaemontana catharinensis* ao longo do armazenamento em três condições distintas: sala de crescimento (25 ±1 °C), geladeira (10 ±1 °C) e câmara fria (4 ±1 °C).



Em teores de água superiores a 14%, a respiração aumenta rapidamente na maioria das sementes ocasionando sua deterioração. Dentre as principais alterações envolvidas na deterioração de semente, destacam-se o esgotamento das reservas, a alteração da composição química, como a oxidação de lipídios e a quebra parcial

das proteínas, a alteração das membranas celulares, com redução da integridade e aumento da permeabilidade e desorganização, e alterações enzimáticas e de nucleotídeos (VILLELA; PERES, 2004). De acordo com Demito e Afonso (2009), a redução da temperatura é uma técnica economicamente viável para preservar a qualidade de sementes armazenadas, pois embora o processo de deterioração é inevitável, o mesmo pode ser retardado dependendo das condições de armazenamento e das características da semente (CARDOSO et al., 2012).

Dados da primeira contagem são demonstrados na Tabela 4. Não houve diferença significativa entre os tempos de armazenamento, para as condições  $25 \pm 1$  °C (sala de crescimento) e  $10 \pm 1$  °C (refrigerador). Para a condição  $4 \pm 1$  °C (câmara fria), sementes armazenadas por 90 dias apresentaram 29% de germinação no 15º dia, ocorrendo redução de 72,5% na germinação da primeira contagem quando comparado com os 120 dias de armazenamento (8%). Não foi demonstrada diferença significativa entre as médias das condições de armazenamento, resultado próximo das médias foram obtidos no tempo zero (controle), 15% (dados não demonstrados).

Tabela 4 – Primeira contagem (%) de germinação de sementes de *Tabernaemontana catharinensis*, nas condições e intervalo de tempo de armazenamento.

	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO EM DIAS						
		30	60	90	120	150	180	MÉDIA
1º Contagem (15 dias)	$25 \pm 1$ °C	18,0 a	10,0 a	26,0 a	8,0 a	25,0 a	26,0 a	18,8 A
	$10 \pm 1$ °C	14,0 a	11,0 a	17,0 a	10,0 a	21,0 a	12,0 a	14,2 A
	$4 \pm 1$ °C	14,0 c	10,0 c	29,0 a	8,0 c	18,0 b	22,0 b	16,8 A

\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as condições de armazenamento em cada tempo de armazenamento, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

A qualidade das sementes não pode ser melhorada durante o armazenamento, mas pode ser preservada quando as condições de conservação são favoráveis. Segundo Pádua e Vieira (2001), lotes de sementes com percentagens de germinação semelhantes, mas com diferentes níveis de vigor, podem apresentar comportamentos diferenciados em relação à deterioração, dependendo das condições de armazenamento. A preservação da qualidade fisiológica das sementes é fundamental para a manutenção dos bancos de

germoplasma e no processo de repovoamento da vegetação em áreas degradadas, pois permite o uso de espécies vegetais em épocas e locais diferentes aos de sua origem.

A primeira contagem, conjuntamente com a velocidade de germinação pode ser utilizada para avaliar a germinação mais rápida em campo ou em estufa, minimizando assim as condições adversas que ocorrem durante a germinação e estabelecimento de plântulas. E como a produção de sementes é limitada no tempo, a rapidez na germinação é de fundamental importância para garantir o sucesso de sobrevivência e perpetuação da espécie (NASCIMENTO; PEREIRA et al., 2007).

## CONCLUSÃO

Independente do regime de luz (fotoperíodo de 16 horas ou escuro contínuo), temperaturas de 25 e 30 °C, promovem maior percentagem de germinação das sementes de *T. catharinensis*, variando de 83 a 89%. Na ausência de luz foram observadas as maiores médias de velocidade de germinação e vigor. Na temperatura de 15 °C ocorre inibição total da germinação. Sementes de *T. catharinensis* comportam-se como fotoblásticas neutras.

O armazenamento das sementes de *T. catharinensis* em (câmara de crescimento a 25 °C, refrigerador a 10 °C e câmara fria a 4 °C) por 180 dias reduz o teor de água das sementes, não ocorrendo redução no potencial germinativo, demonstrando um comportamento ortodoxo.

As três condições de armazenamento das sementes (câmara de crescimento a 25 °C, refrigerador a 10 °C e câmara fria a 4 °C) são eficientes para manter a viabilidade de sementes de *T. catharinensis* por 180 dias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI A. A.; ANDERSON J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOZLOWSKI, T. T. **Seed Biology**. New York, Academic Press. v.2, p.283-315, 1972.
- AGUIAR, I. B.; Conservação de sementes. In: IF SÉRIE REGISTROS. **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, n. 14, p. 1-98, 1995.
- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, p.121-125, 1998.

BERBERT, P. A. et al. Qualidade fisiológica de semente de mamão em função da secagem e do armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.30, n.1, p.40-48, 2008.

BORBA FILHO, A. B.; PEREZ, S. C.; ANDRADE, J. G. de. Armazenamento de sementes de ipê-branco e ipê-roxo em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.31, n.1, p.259-269, 2009.

BORGHETTI, F. Temperaturas extremas e a germinação de sementes. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. (Ed.) **Estresses ambientais: Danos e benefícios em plantas**. Recife: UFPE, 2005. p.207-218.

BOTELHO, L. S.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifoli*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2008.

BRASIL. 2009. **Regras para análise de sementes**. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Brasília: MAPA/SDA/CGAL, 2013. 97p.

CARDOSO, R. B.; BINOTTI, F. F. da S.; CARDOSO, E. D. Potencial fisiológico de sementes de crambe em função de embalagens e armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v.42, p.272-278, 2012.

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

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

DEMITO, A.; AFONSO, A. D. L. Qualidade das sementes de soja resfriadas artificialmente. **Engenharia na Agricultura**. Viçosa, v.17, p.7-14, 2009.

DOUSSEAU, S. et al. Germinação de sementes de tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): influência da temperatura, luz e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.32, n.2, p.438-443, 2008.

FERRAZ-GRANDE, F. G. A.; TAKAKI, M. Efeitos da luz, temperatura e estresse de água na germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Caesalpinoideae). **Bragantia**. Campinas, v. 65, n. 01, p.37-42, 2006.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**. v.6, n.2, p.36-41, 2008.

GALINDO, E. A. et al. Germinação e vigor de sementes de *Crataeva tapia* L. em diferentes temperaturas e regimes de luz. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, v.43, n.1, p.138-145, 2012.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Storage. In: **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries & Genetic Resources, 2003.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v.48, n.2, p.263-284, 1976.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 3, 1ª Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 384, 2009.

MACHADO, C. F. et al. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nicholson). **Revista Cerne**. Lavras, v.8, n.2, p.17-25, 2002.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**. Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

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

MORTELE, L. M. et al. Influência do estresse hídrico sobre o desempenho fisiológico de sementes de híbridos simples de milho-pipoca. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.32, p.1810-1817, 2008.

NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. S. Testes para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface e sua relação com a germinação sob temperaturas adversas. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.29, n.3, p.175-179, 2007.

NETO, A. F. et al. Influência da embalagem e do local de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de abóbora 'Jacarezinho' (*Curcubita moschata* Duch). **Engenharia na Agricultura**. Viçosa, v.22, n.4, p.294-305, 2014.

NETO, A. L. dos S. et al. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de Sambacaitá (*Hyptis pectinata* (L.) Poit). **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.14, n.4, p.19-26, 2008.

NOGGLE, G. R.; FITES, R. C. The mechanisms of chilling damage in germinating seeds. In: PACHECO, M. V. et al. Germination and vigor of *Dimorphandra mollis* Benth. seeds under different temperatures and substrates. **Revista Árvore**. Viçosa, v.34, n.2, p.205-213, 2010.

NOGUEIRA, F. C. B. et al. Efeito da temperatura e luz na germinação de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Alemão) Ducke - Fabaceae. **Acta Botânica Brasilica**. Belo Horizonte, v.26, n.4, p.772-778, 2012.

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

OLIVEIRA, P. G.; GARCIA, Q. S. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *S. elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* Silveira (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasilica**. Belo Horizonte, v.19, n.3, p.639-45, 2005.

PÁDUA, G. P.; VIEIRA, R. D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v. 23, n. 2, p.255-262, 2001.

PEREIRA, G. F. A. Fungos de armazenamento em lotes de sementes de soja descartados no estado de Minas Gerais na safra 1989/90. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.6, n.2, p.216-219, 1994.

PEREIRA, P. S et al. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. **Química Nova**. São Paulo, v.31, n.1, p.20-24, 2008.

QUINET, C. G. P.; ANDREATA, R. H. P. Estudo Taxonômico e Morfológico das Espécies de Apocynaceae Adans na Reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Pesquisa Botânica**, v. 56, p. 13-74, 2005.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.4, p.499-514, 1973.

SANTOS, D. L. et al. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. e *Tabebuia róseo alba* (Ridl) Sand - Bignoniaceae. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 15, n. 01, p. 87-92, 2005.

SCHUMACHER, M. V.; HOPPE, J. M.; FARIAS, J. A. **Manual de instruções para a coleta, beneficiamento, armazenamento e análise de sementes florestais**. Santa Maria: UFSM/AFUBRA, Projeto Bolsa de Sementes de Espécies Florestais, p. 28, 2002.

SILVA, J. S. et al. Indicadores da qualidade dos grãos. In: SILVA, J. S. (Ed.). **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2008. p.63-107.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande Do Sul, Brasil**. São Carlos, SP, p. 350, 2006.

STEFANELLO R. et al. Efeito da luz, temperatura e estresse hídrico no potencial fisiológico de sementes de funcho. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v. 28, p.135-141, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TOLEDO, M. Z. et al. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v.39, p.124-133, 2009.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. p.265-281.

ZONTA, J. B. et al. Armazenamento de sementes de pinhão manso em diferentes embalagens e ambientes. **Jornal Biociências**. Uberlândia, v.30, n.2, p.599-608, 2014.

## 4 CAPÍTULO II

### GERMINAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC

## GERMINAÇÃO DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC

### RESUMO

*Tabernaemontana catharinensis* possui grande relevância medicinal e ecológica, sendo nativa do Rio Grande do Sul e popularmente conhecida como “cobrina”, dada a importância a conservação e estocagem de germoplasma são fundamentais para reduzir danos da extração não controlada em seu habitat. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a germinação das sementes de cobrina, em função da pré-imersão em ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e estudar o efeito da 6-benzilaminopurina (BAP) associada ao ácido naftalenoacético (ANA) na propagação *in vitro* e do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de microestacas. Foram testadas diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>: 0; 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> por 24 ou 48 horas de pré-imersão na germinação *in vitro* de sementes. Posteriormente, segmentos cotiledonares de plântulas obtidas *in vitro* foram cultivados em meio de cultivo contendo diferentes combinações de (BAP) e (ANA): 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para a indução de enraizamento, foram cultivadas microestacas de 90 dias em meio contendo ácido indolbutírico (AIB) por 30 dias, nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>. As características avaliadas foram a percentagem e índice de velocidade de germinação; percentagem de regeneração de brotos; número, comprimento, massa fresca de brotos e número de folhas aos 45 dias após a inoculação dos explantes; percentagem de enraizamento, massa fresca, comprimento, área superficial, volume e número de pontas de raízes e teores de pigmentos fotossintéticos das microestacas aos 30 dias após a inoculação. A percentagem de germinação das sementes não diferiu significativamente entre as variáveis concentração de GA<sub>3</sub> e tempo de imersão. Concentrações de 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> por 48h de pré-imersão reduziram a velocidade de germinação. Ocorreu organogênese direta de brotações adventícias em explantes cotiledonares sem a necessidade de fitorreguladores de crescimento. A adição de BAP associado ao ANA no meio de cultura maximizou as variáveis número de brotos, folhas e massa fresca das brotações. Concentrações altas de BAP e ANA, 6,0 x 0,6 e 4,0 x 0,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, promoveram aumento no comprimento das brotações. Para o enraizamento de microestacas a suplementação de 1,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB ao meio de cultura proporcionou maiores taxas de enraizamento (96,5 e 89%, respectivamente). A presença do regulador de crescimento AIB incrementa todos os parâmetros analisados.

**Palavras-chave:** Cobrina. Micropropagação. Segmento Cotiledonar. Enraizamento de Microestacas.

## SEED GERMINATION AND IN VITRO ESTABLISHMENT of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC

### ABSTRACT

*Tabernaemontana catharinensis* has great medicinal and ecological importance, being a native species to Rio Grande do Sul and it is popularly known as *cobrina*, given the importance of conservation and germplasm storage are essential to reduce the damage from uncontrolled extraction in their habitat. Then, the aim of this study was to evaluate the germination of *cobrina* seeds, pre-soaking function in gibberellic acid ( $GA_3$ ) and also to study the effect of 6-benzylaminopurine (BAP) associated with naphthalene acetic acid (NAA) in vitro propagation and indolebutyric acid (IBA) on rooting of microcuttings. Different concentrations of  $GA_3$ : 0; 300 and 400 mg L<sup>-1</sup> for 24 or 48 hours of pre-soaking in vitro seed germination. Subsequently, cotyledonary segments of seedlings grown in vitro were cultivated in culture medium that contained different combinations (BAP) and (NAA) 0.0; 1.0; 2.0; 4.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup> and 0.0; 0.1; 0.2; 0.4 and 0.6 mg L<sup>-1</sup>, respectively. For rooting induction, 90 days microcuttings were cultured in medium containing indolebutyric acid (IBA) for 30 days, at concentrations of 0.0; 1.0; 2.0; 4.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup>. The characteristics that we evaluated were: the percentage and germination speed index; percentage of shoot regeneration; number, length, fresh weight of shoots and number of leaves at 45 days after inoculation of the explants; rooting percentage, fresh weight, length, surface area, volume and number of roots and tips of photosynthetic pigments contents of micropiles 30 days after inoculation. The percentage of seed germination did not vary significantly between the variables concentration of  $GA_3$  and immersion time. Concentrations of 300 and 600 mg L<sup>-1</sup> of  $GA_3$  for 48h of pre-soaking reduced the germination rate. There was a direct organogenesis of adventitious shoots in cotyledon explants without the need for growth regulators. The addition of BAP associated with NAA in the culture medium maximized the number of shoots, leaves and fresh mass of shoots variables. High concentrations of BAP and NAA, 6.0 x 0.6 and 4.0 x 0.4 mg L<sup>-1</sup>, respectively, led to an increase in the length of the shoots. For rooting microcuttings the supplementation of 1.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup> of IBA to the culture medium resulted in the highest rooting rate (96.5 and 89%, respectively). The presence of IBA growth regulator increases all parameters.

**Keywords:** Cobrina. Micropropagation. Cotyledon Segment. Rooting of Microcuttings.

## INTRODUÇÃO

O número limitado de estudos dos principais processos básicos da germinação das sementes de plantas lenhosas e nativas tem dificultado a realização de programas de reflorestamento e melhoramento genético com espécies de potencial medicinal (NASCIMENTO et al., 2007). A vasta diversidade da flora brasileira e a busca por novos princípios ativos tem atraído a atenção de grandes empresas dos setores farmacêutico, de agronegócio, de química industrial e cosméticos. Tal interesse é produto da acentuada valorização mundial do uso de plantas medicinais, o qual vem crescendo nas últimas décadas (MATOS, 2011).

*Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae) é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, sendo também encontrada na Argentina, Paraguai e Bolívia (PEREIRA et al., 2008). Planta pioneira medindo de 3 a 8 m de altura, popularmente conhecida como “cobrina”, “jasmim-cata-vento”, “leiteira de dois irmãos” e “casca de cobra” (QUINET; ANDREATA, 2005). O chá ou a infusão das folhas e cascas são utilizados na medicina popular como antídoto para picadas de cobra, para aliviar dor de dente, tratamento de feridas, herpes, tumores e ainda como hemostática, hipotensora, cardiotônica e também como vermífugo (PEREIRA et al., 2005).

A espécie é rica em flavonoides, saponinas, terpenos, alcaloides e esteroides (CHI et al., 2005) sendo que os alcaloides e terpenos são classes fitoquímicas particularmente importantes quando se considera a atividade inseticida de compostos naturais (FERREIRA et al., 2001). Estudos fitoquímicos da espécie demonstraram que os ramos possuem atividade antioxidante maior do que os frutos, revelando além da rutina, um glicosídeo de quercetina e ácido clorogênico, ambos reconhecidos como ativos antioxidantes (PIANA et al., 2014). A espécie possui também um imenso potencial ornamental, sendo indicada para reflorestamentos mistos destinados à recuperação de mata nativa (SOBRAL et al., 2006).

Dada a importância da espécie, a busca por mecanismos para obtenção de plântulas com alta qualidade genética e fitossanitária são imprescindíveis e constituem o ponto de partida para o estabelecimento de povoamentos comerciais produtivos e na conservação e estocagem de germoplasma. A germinação *in vitro* para algumas espécies permite maior germinabilidade das sementes, possivelmente em função das condições do cultivo *in vitro* oferecer maior controle do que as condições de viveiro (NOLETO; SILVEIRA, 2004). Além disso, as plântulas obtidas a

partir da germinação das sementes *in vitro* podem ser utilizadas como fonte de explantes assépticos para a organogênese.

Superados os processos para obtenção de plântulas assépticas, a multiplicação *in vitro* constitui excelente alternativa a ser empregada para manutenção e produção de um grande número de plantas, especialmente espécies consideradas em perigo ou em extinção. Essas espécies podem se tornar disponíveis em proporções comerciais e assim será possível reduzir danos da extração não controlada em seu habitat (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012). Na multiplicação *in vitro* algumas técnicas utilizadas têm-se destacado, como a micropropagação, a microenxertia, cultura de embriões e a microestaquia, sendo a escolha de uma delas determinada pela disponibilidade de material vegetativo.

A micropropagação destaca-se na área florestal e de espécies com potencial medicinal pela ampla possibilidade de aplicação e por servir de base para outras técnicas biotecnológicas (XAVIER et al., 2009). Contudo, resultados da micropropagação de *T. catharinensis* ainda são incipientes, não se dispondo de protocolos que possibilitem a obtenção de plantas assépticas e com alta taxa de multiplicação.

Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* de das sementes de cobraína (*Tabernaemontana catharinensis*), em função da pré-imersão em ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e estudar o efeito da 6-benzilaminopurina (BAP) associada ao ácido naftalenoacético (ANA) na propagação *in vitro* e do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de microestacas.

## **METODOLOGIA**

### **Experimento I - Pré-imersão das sementes em GA<sub>3</sub>**

Frutos de *Tabernaemontana catharinensis* (cobraína) foram coletados no terço médio lateral de cinco matrizes com cerca de 4 m de altura e localizadas em remanescente vegetal, no município de Ijuí, região Noroeste do Rio Grande do Sul, no mês de junho de 2015. As sementes foram submetidas ao processo de secagem natural sobre bandeja com fundo de tela por cinco dias. Em câmara de fluxo laminar as mesmas foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos e após, enxaguadas três vezes em água destilada e esterilizada. Em seguida, foram imersas em ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) nas concentrações de 0,0; 300 e 600 mg L<sup>-1</sup>, em dois regimes de tempo, 24 e 48h.

Após a imersão, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio medindo 25 X 150 mm (uma semente por tubo) contendo 15 mL de meio de cultura com 30% dos sais minerais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, fungicida Maxim<sup>®</sup> (princípio ativo fludioxonil) na concentração de 1,0 mL L<sup>-1</sup> e bactericida Chlortetracycline 0,3 mg L<sup>-1</sup>. Após foi semi-solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar em pó bacteriológico puro Vetec e esterilizado em autoclave a 1 atm, 120 °C por 20 min.

O experimento foi em esquema bifatorial 3x2 (três concentrações de GA<sub>3</sub> (0,0; 300 e 600 mg L<sup>-1</sup>) x dois tempos de imersão (24 e 48h)), totalizando seis tratamentos com quatro repetições por tratamento e 15 sementes por repetição, em delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas a cada três dias, até a estabilização da germinação em cada tratamento. Os parâmetros avaliados foram a percentagem de germinação (%G), conforme Labouriau e Valadares (1976), sendo considerada emergida quando os cotilédones estavam totalmente livres acima do meio de cultivo, e o índice de velocidade de germinação (IVG) conforme (MAGUIRE, 1962).

#### Experimento II – Micropropagação

Em câmara de fluxo laminar, segmentos cotiledonares de 1 cm de plântulas obtidas da germinação *in vitro*, com 70 dias de idade, foram inoculados em meio de cultura contendo 100% dos sais minerais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 6 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona, fungicida Maxim<sup>®</sup> 2,5 µl L<sup>-1</sup> e bactericida Chlortetracycline 0,15 mg L<sup>-1</sup>. Antes da semi-solidificação com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e autoclavagem a 1 atm, 120 °C por 20 min, os meios foram acrescidos das combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 mg L<sup>-1</sup>), respectivamente, totalizando cinco tratamentos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, quatro repetições por tratamento e sete explantes por repetição, totalizando 28 explantes por tratamento. Após 45 dias da inoculação as avaliações foram realizadas, obtendo-se a percentagem de regeneração de brotos, número de brotações e folhas. Por meio de três amostras de cada repetição foram avaliados comprimento médio do maior broto com auxílio de paquímetro digital em milímetros

(mm) e massa fresca das brotações, em balança analítica de precisão em miligramas (mg).

#### Experimento III – Enraizamento *in vitro* de microestacas

Plântulas com 90 dias de idade obtidas no experimento I foram doadoras de microestacas para o estudo de enraizamento *in vitro*. Microestacas de quatro cm de comprimento, contendo três pares de folhas, foram inoculadas em meio de cultura com 100% dos sais minerais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e adicionado fungicida Maxim<sup>®</sup> 2,5 µl L<sup>-1</sup>, bactericida Chlortetracycline 0,15 mg L<sup>-1</sup> e semi-solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Aos meios foi adicionado ainda ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>, totalizando cinco tratamentos com quatro repetições por tratamento e sete explantes por repetição em delineamento experimental inteiramente casualizado.

Aos 30 dias após a inoculação as avaliações foram realizadas obtendo-se a percentagem de enraizamento. Através de quatro amostras por repetição foi obtida a massa fresca em balança analítica de precisão em miligramas (mg), comprimento, área superficial, volume e número de pontas de raízes através da digitalização com auxílio de um scanner Epson 11000 XL e analisadas com ajuda do Software WinRhizo Pro.

Para obtenção dos teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas das microestacas enraizadas, o material vegetal foi macerado em acetona 80%, onde determinou-se os teores de clorofilas *a*, *b*, clorofilas totais e carotenoides (mg g<sup>-1</sup> MF), obtidos por espectrofotometria de UV a 663 nm, 645 nm e 480 nm, conforme metodologia de Arnon (1949).

Para os três experimentos o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Os tubos foram fechados com papel alumínio e as culturas foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25 ±1 °C e fotoperíodo de 16 horas (densidade de fluxo de fótons de 35 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias).

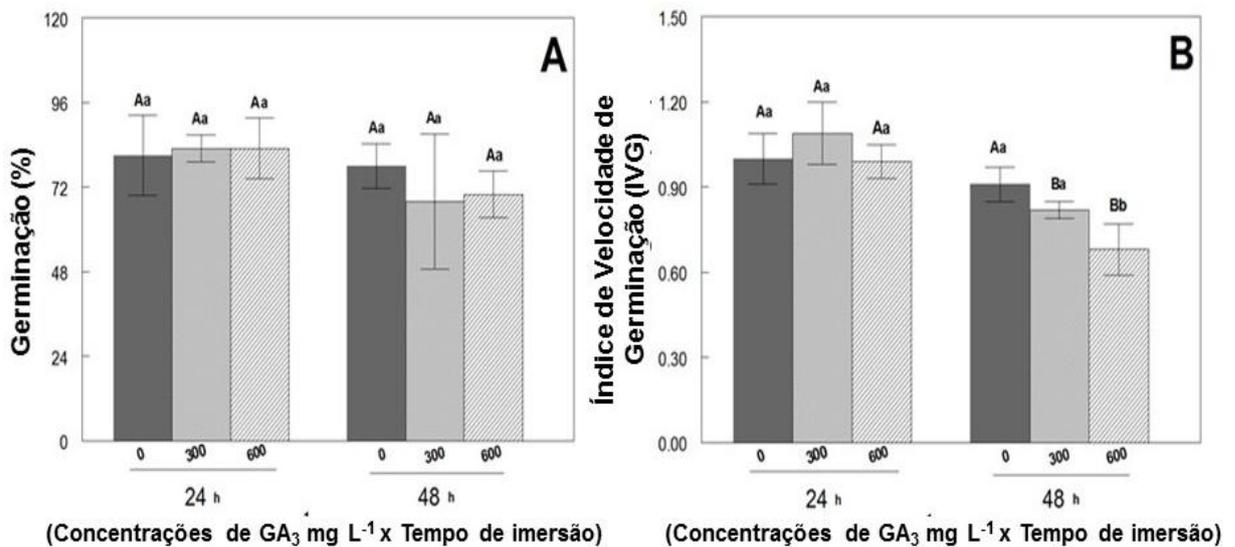
Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das variáveis dos três experimentos comparadas pelo teste Scott-knott, a 5% de probabilidade de erro, utilizando o aplicativo Sisvar (FERREIRA, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento I - Pré-imersão das sementes em GA<sub>3</sub>

Os resultados da análise de variância (Figura 1) não demonstrou efeito significativo pelo teste de Scott-knott para a percentagem de germinação. As concentrações de GA<sub>3</sub> e tempos de imersão não influenciaram a germinação das plântulas, ficando está numa faixa de 68 a 83%. Para a variável IVG houve diferença significativa entre os tratamentos; sementes imersas por 24h em 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, quando comparadas com aquelas imersas por 48h nas referidas concentrações obtiveram maior velocidade de germinação. Além disso, sementes imersas por 48h em 600 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> apresentaram menor IVG (Figura 1B), quando comparado com os demais tratamentos.

Figura 1 – Percentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação (B) de *Tabernaemontana catharinensis* em condições *in vitro*.



\*Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tempo de imersão dentro da mesma concentração de GA<sub>3</sub>. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de GA<sub>3</sub> dentro do tempo de imersão, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

A germinação é um fenômeno caracterizado pela retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula, manifestando a capacidade para dar origem a uma plântula normal, sob condições favoráveis (NEVES et al., 2009). Como forma de acelerar e melhorar a germinação de sementes e também promover o crescimento das plântulas jovens, vários

pesquisadores preconizaram o uso de fitorreguladores vegetais (NETO et al., 2007). As giberelinas possuem efeito estimulatório no processo germinativo quando aplicadas em sementes com dormência e também em não dormentes. As sementes podem necessitar de giberelinas para uma série de eventos: ativação do crescimento vegetativo do embrião, mobilização das reservas do endosperma e no enfraquecimento da camada de endosperma que circunda o embrião, favorecendo assim seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os tratamentos ausentes de GA<sub>3</sub> (controles) responderam satisfatoriamente para percentagem de germinação e IVG. Estas respostas obtidas podem ser devido a presença de concentrações de giberelina endógena. Bewley; Black apud Lima et al. (2009) reportaram sobre a presença de hormônios na semente, sendo sua ação relacionada com o crescimento do embrião. Dentre os hormônios presentes nas sementes, o de mais largo espectro de atuação são as giberelinas. De acordo com Sousa et al. (2002) a aplicação de ácido giberélico em sementes de porta enxertos cítricos também não surtiu efeito significativo sobre a germinação. Tal fato foi atribuído a um adequado nível endógeno do referido hormônio nas sementes, de forma que a adição de GA<sub>3</sub> não interferiu em seu desempenho durante a germinação.

Aplicações de giberelinas geralmente induzem a uma maior rapidez na germinação de sementes observada nos primeiros dias de tratamento, culminando posteriormente em um maior vigor (STENZEL et al., 2003; ARAGÃO et al., 2006), entretanto, neste trabalho, a redução no IVG nas sementes expostas a um maior tempo de imersão (48h), observando significância estatística, pode ter culminado em um grande período de exposição ao GA<sub>3</sub> exógeno surtindo um efeito fitotóxico, quando somado a níveis endógenos (POMPELLI, 2006).

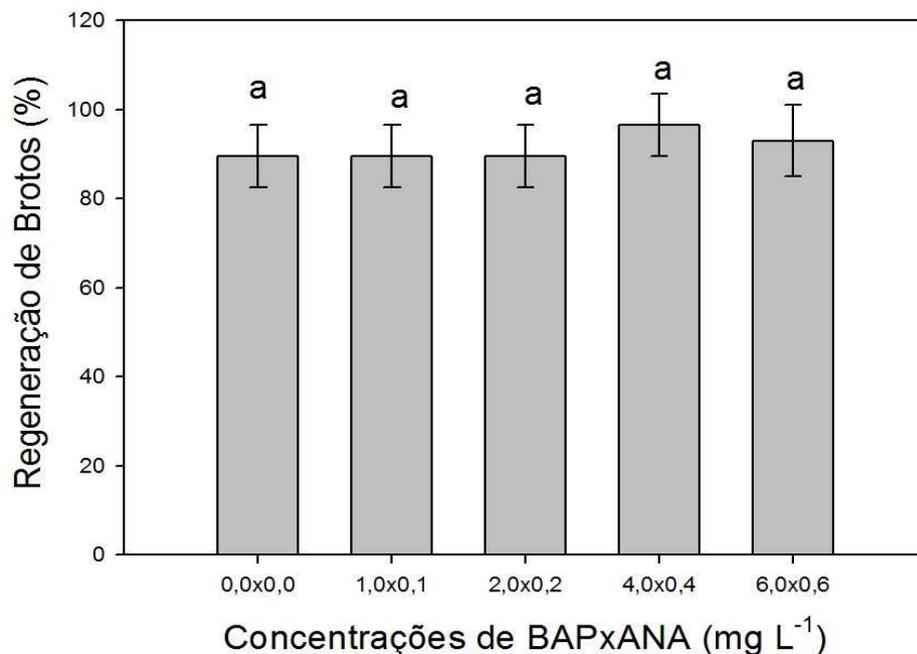
Ainda, suplementações com fitorreguladores de crescimento podem causar efeito inibidor devido à ocorrência de sinergismo entre as concentrações aplicadas e a quantidade endógena de giberelina existente em sementes (SCALON et al., 2006). Neto et al. (2007), observaram que a embebição em 200 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> proporcionou aumento significativo do IVG, indicando efeito positivo desta substância na melhoria do desempenho das sementes de jenipapeiro.

## Experimento II - Micropropagação

Nas condições do experimento (concentrações de BAP e ANA no meio de cultivo), segmentos cotiledonares não formaram plantas completas, apenas brotações aéreas. Os resultados mostram que a organogênese direta de brotações adventícias em explantes cotiledonares de cobrina pode ser induzida sem a necessidade de fitorreguladores de crescimento (Figura 2).

O processo de morfogênese é controlado pelo balanço hormonal entre auxinas e citocininas. Este balanço hormonal é muito peculiar e é influenciado por vários fatores, como espécie, tipo e idade do explante, níveis endógenos de hormônios vegetais e o meio de cultura (LOPES DA SILVA et al., 2012). Oliveira et al. (2003) observaram na multiplicação *in vitro* de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* que o meio MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP promoveu a produção de novas brotações adventícias em 83% dos segmentos cotiledonares.

Figura 2 – Percentagem de regeneração de brotos de segmentos cotiledonares de *Tabernaemontana catharinensis*.



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na ausência de fitorreguladores vegetais foi verificado também a formação de brotos em segmentos nodais e cotiledonares de *Tapirira guianensis* Aubl. (GUTIÉRREZ et al., 2013), *Aniba rosaeodora* Ducke (JARDIM et al., 2010) e

*Syzygium cordatum* Hochst. ex C. Krauss (DEWIR et al., 2011). Essa maior capacidade morfogênica de alguns tecidos pode ser causada pela variabilidade genética de cada espécie (GEORGE; DEBERGH, 2008).

O número de brotos e folhas, comprimento de brotações e a massa fresca das brotações podem ser maximizados com a adição de BAP associada ao ANA no meio de cultura (Tabela 1); porém, altas concentrações não afetaram significativamente as referidas variáveis para explante cotiledonar, concentrações a partir de  $2,0 \times 0,2 \text{ mg L}^{-1}$  (BAPxANA) promoveram maior número de brotos por explante. O aumento das concentrações de BAP e ANA no meio MS promoveu o aumento do comprimento médio da maior brotação de explantes cotiledonares, atingindo um máximo de 14,81 mm na concentração de  $6,0 \times 0,6 \text{ mg L}^{-1}$  (BAPxANA). Para as variáveis massa fresca dos brotos e número de folhas não foi demonstrando diferença significativa entre os tratamentos com presença dos fitorreguladores BAP e ANA no meio (Tabela 1).

As citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações até determinada concentração, a partir da qual pode ocorrer diminuição em virtude de possível efeito fitotóxico (REIS et al., 2008). O efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode estar relacionado à influência desse regulador na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical (BRUM et al., 2002; MONFORT et al., 2012).

**Tabela 1** – Valores médios do número de brotos, comprimento de brotações, massa fresca dos brotos e número de folhas de explantes cotiledonares de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC aos 45 dias após a inoculação.

BAP x ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Nº de Brotos	Comp. de Brotações (mm)	Massa Fresca dos Brotos (mg)	Nº de Folhas
0,0 x 0,0	1,18 c	5,01 c	10,85 b	3,83 b
1,0 x 0,1	2,08 b	11,84 b	24,53 a	7,33 a
2,0 x 0,2	3,23 a	11,29 b	28,84 a	7,55 a
4,0 x 0,4	2,58 a	14,16 a	27,74 a	6,63 a
6,0 x 0,6	2,70 a	14,81 a	28,08 a	7,03 a

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Macêdo et al. (2003) relataram que concentrações mais baixas de BAP e ANA facilitam a individualização dos brotos e apresentam bons resultados para número

de brotos e massa fresca, corrobora, com os resultados encontrados no presente trabalho, onde a concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP associada a 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA tendeu a promover maior número e massa fresca de brotos (3,23 e 28,84 mg, respectivamente). As citocininas podem favorecer o alongamento de brotos; contudo, é necessário que se adicione ao meio a concentração adequada, sendo esta específica para cada espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em segmentos cotiledonares de angico-vermelho (*Parapiptadenia rígida*) ocorreu um efeito negativo no comprimento dos brotos formados em explantes tratados com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (KIELSE et al., 2009). O mesmo efeito negativo foi verificado para a acácia-negra (*Acacia mearnsii*), no crescimento dos brotos quando utilizada a concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (BORGES JÚNIOR et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados por Gutiérrez et al. (2013) em pau-pombo (*Tapirira guianensis*), para o qual, aos 60 dias, independentemente do explante utilizado (cotiledonar ou nodal), o maior número médio de brotos (3,21) foi observado na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, sem a associação com ANA.

O incremento no número de folhas na etapa de multiplicação é bastante favorável, pois cada folha dará origem a um novo broto e conseqüentemente aumentará a produção de novas mudas (DA COSTA et al., 2010), além de auxiliar na fase de aclimatização (MOREIRA et al., 2006); segmentos com maior número de folhas poderão ter maior índice de sobrevivência, pois as folhas são as estruturas responsáveis pela captação de energia solar e produção de matéria orgânica através da fotossíntese, auxiliando no processo de aclimatização na qual a planta passará de uma fase heterotrófica para autotrófica. Decréscimo no número de folhas em resposta ao aumento de concentrações de BAP associada ao ANA, observados em relação às concentrações menores, pode ser atribuído ao fato de o regulador de crescimento BAP estimular a formação de maior número de brotos, porém, de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas (VILLA et al., 2005).

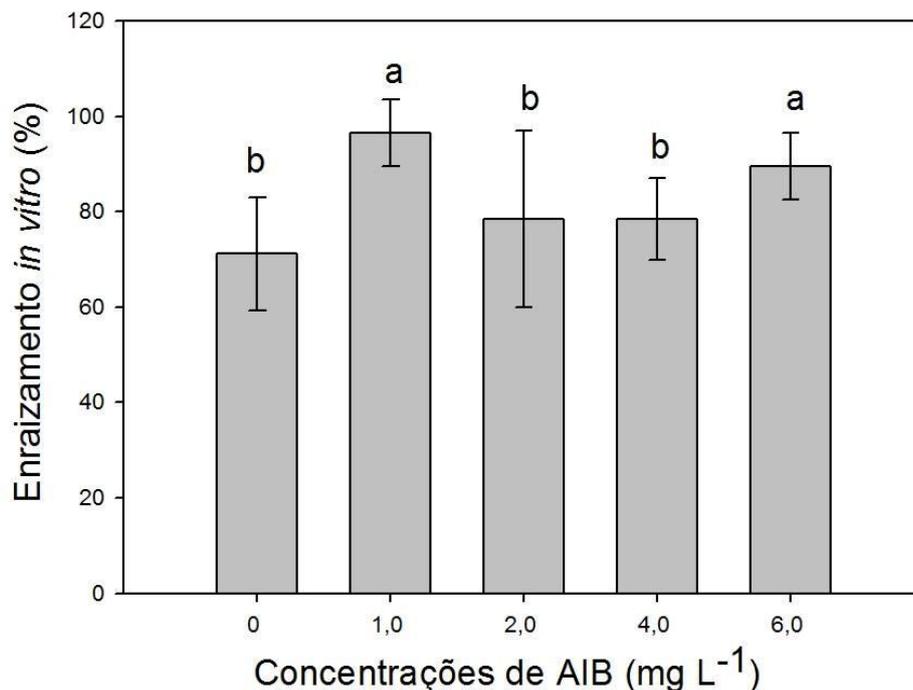
Para todas as variáveis analisadas na multiplicação *in vitro* de plantas de cobrina pode ter ocorrido sinergismo dos fitorreguladores de crescimentos testados. Essa interação pode atuar sinérgica ou antagonicamente, uma vez que a presença de um determinado fitorregulador pode afetar a biossíntese ou metabolismo de outro, alterando os níveis das substâncias endógenas, ou ainda, fatores ambientais

inerentes ao processo podem modificar as respostas dos fitorreguladores ou, até mesmo, inativá-los (STADEN et al., 2008; GUTIÉRREZ et al. 2013).

### Experimento III - Enraizamento *in vitro* de microestacas

No enraizamento de microestacas houve efeito das diferentes concentrações de AIB na percentagem de microestacas enraizadas (Figura 3). Maiores percentagens de enraizamento foram observadas nas concentrações 1,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup>, com 96,5 e 89,5%, de estacas enraizadas respectivamente, não diferindo significativamente entre si, porém diferiram dos demais tratamentos. Nas concentrações de 0,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB as percentagens de enraizamento não diferiram.

Figura 3 – Percentagem de enraizamento de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* em diferentes concentrações de AIB.



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As auxinas controlam uma grande variedade de processos implicados no desenvolvimento das plantas, entre eles a iniciação de novos meristemas de raízes, apresentando maiores efeitos na formação de raízes adventícias. Dentre as auxinas, o AIB tem apresentado maior eficiência no enraizamento, no entanto, a utilização do regulador de crescimento bem como as concentrações ótimas a serem utilizadas é específica para cada situação (HARTMANN et al., 2002; ROCHA et al., 2007;

XAVIER et al., 2009). A ação das auxinas ocorre, inicialmente, em nível celular nos meristemas primário e secundário, estimulando a divisão celular e o subsequente alongamento das células, sendo que, essa ação inicial das auxinas culmina com a formação das raízes (FORD et al., 2002).

Respostas ao enraizamento satisfatórias encontradas neste trabalho, acima de 70% em todas as concentrações testadas, podem ser características de alto vigor, condicionado a fatores como reservas nutricionais adequadas, status hídrico ótimo, sem aparente condição de estresse, juvenilidade do material utilizado e balanço hormonal endógeno, constituindo fator suficiente para induzir a formação de raízes adventícias, não sendo necessário o uso de fitorreguladores vegetais (XAVIER et al., 2009).

Estacas apicais, geralmente utilizadas na microestaquia, são mais propensas à formação de raízes devido ao grau de maturação fisiológica e de lignificação menor. Acrescentando que as auxinas são sintetizadas em regiões de crescimento ativo principalmente, como gemas terminais e primórdios foliares, contribuindo para elevação dos níveis endógenos desse fitohormônio nas estacas apicais, refletindo em maior potencial de enraizamento (XAVIER et al., 2009; BORGES, 2011). Silva et al. (2010), estudando a propagação da espécie arbórea *Calophyllum brasiliense* através de miniestacas, utilizando propágulos juvenis oriundos de mudas produzidas por sementes, relataram que não foi necessário o uso de fitorreguladores vegetais para o enraizamento.

Dados de massa fresca, comprimento, área superficial, volume e número de pontas de raízes são apresentados na Tabela 2. Os resultados indicam um efeito significativo da adição de AIB nas variáveis analisadas. Para as variáveis massa fresca, área superficial e volume de raiz não houve diferença significativa entre as concentrações de AIB. Para a variável comprimento de raiz, concentrações de 1 e 6 mg L<sup>-1</sup> de AIB demonstraram valores superiores em relação as demais concentrações (15,96 e 15,60 cm, respectivamente). Maior número de pontas de raízes foi observado em microestacas cultivadas na concentração 6,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Uma arquitetura do sistema radicular mais desenvolvida pode influenciar positivamente na absorção de nutrientes e na eficiência no uso da água. Um sistema radicular limitado reduz a atividade radicular, afetando posteriormente a produção de biomassa. Microestacas que apresentam maior área superficial e pontas de raízes são mais aptas a enfrentar condições de estresse, garantindo maiores taxas de

sobrevivência. Além disso, maior número de pontas de raízes aumenta o contato e regiões de absorção de água e de nutrientes. Segundo Maggio et al. (2007) a redução do volume radicular reduz a produção da biomassa fresca da raiz, reduzindo, principalmente, a relação raiz/parte aérea, afetando o transporte dos sais do meio de cultivo para a parte aérea.

**Tabela 2** – Valores de massa fresca ( $MF_{Raiz}$ ), comprimento ( $COM_{Raiz}$ ), área superficial ( $AS_{Raiz}$ ), volume ( $VOL_{Raiz}$ ) e número de pontas ( $N^{\circ}P$ ) de raízes de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., avaliadas aos 30 dias após a inoculação em concentrações de AIB.

AIB ( $mg L^{-1}$ )	$MF_{Raiz}$ (mg)	$COM_{Raiz}$ (cm)	$AS_{Raiz}$ ( $cm^2$ )	$VOL_{Raiz}$ ( $cm^3$ )	$N^{\circ}P$
0,0	18,7 b	6,32 c	1,26 b	0,021 b	3,2 c
1,0	37,13 a	15,96 a	2,95 a	0,043 a	5,58 b
2,0	30,08 a	11,94 b	2,27 a	0,034 a	5,13 b
4,0	35,33 a	13,31 b	2,68 a	0,043 a	5,25 b
6,0	38,88 a	15,60 a	2,87 a	0,042 a	8,63 a

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Sistema radicular mais desenvolvido em plantas *in vitro* é considerado benéfico, uma vez que é importante para a posterior aclimatização (CANTO et al., 2004). A aclimatização é uma fase relevante e ao mesmo tempo crítica da micropropagação, podendo causar baixa sobrevivência das plantas, devido principalmente, ao estresse que sofrem na passagem da condição *in vitro* para o *ex vitro*; passando de um ambiente de baixa transpiração para ambiente de alta taxa de transpiração, de um estado heterotrófico para o estado autotrófico, de um meio com alta disponibilidade de nutrientes para um substrato com menor disponibilidade e de um estado asséptico para ficar sujeito ao ataque de microrganismos patogênicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; VILLA et al., 2007).

O crescimento acelerado das raízes pode ocorrer em função do estado nutricional da planta, mostrando que as microestacas são capazes de oferecer carboidratos, hormônios e outras substâncias necessárias ao alongamento das raízes, seja pela absorção do meio nutritivo e/ou pela produção através da fotossíntese. Quanto mais bem nutrida a planta, maior o número de células produzidas pelos meristemas e mais longo será o eixo de crescimento (DIAS et al.,

2012). A formação de raízes adventícias é um processo que exige elevada energia, por envolver a divisão celular, na qual as células predeterminadas alteram a rota morfogênica para formar os primórdios radiciais (BRONDANI et al., 2012). Segundo Haq et al. (2009), as reservas de carboidratos nas microestacas de *Olea europaea* constituíram a principal fonte de energia para a iniciação dos primórdios radiciais.

Quando analisado os teores de pigmentos fotossintéticos (Tabela 3), não houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis chl *a*, total, relação chl *a/b* e carotenóides. Com relação aos teores de chl *b*, a presença de AIB no meio de crescimento promoveu um incremento nos teores deste pigmento, quando comparado com o tratamento sem AIB (controle), além da tendência de maior concentração de chl *a*, total e carotenóides nos tratamentos com AIB.

**Tabela 3** – Valores médios da clorofila *a* (Chl<sub>a</sub>), *b* (Chl<sub>b</sub>), total (Chl<sub>total</sub>), relação entre clorofila *a* e *b* (Chl *a/b*) e carotenóides em folhas de microestacas de cobrina (*Tabernaemontana catharinensis* A. DC.) expostas à diferentes concentrações de AIB aos 30 dias após a inoculação. MF refere-se à matéria fresca.

AIB (mg L <sup>-1</sup> )	Chl <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl total (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl <u>a/b</u>	Carotenóides (mg g <sup>-1</sup> MF)
0,0	1,33 a	0,36 b	1,69 a	3,74 a	0,36 a
1,0	1,41 a	0,41 a	1,82 a	3,47 a	0,40 a
2,0	1,54 a	0,44 a	1,98 a	3,47 a	0,43 a
4,0	1,55 a	0,45 a	2,00 a	3,45 a	0,44 a
6,0	1,55 a	0,45 a	2,00 a	3,43 a	0,43 a

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As clorofilas são os principais pigmentos cloroplastídicos responsáveis pela captação de radiação solar que durante o processo de fotossíntese é convertida em energia química na forma de ATP e NADPH (MARENCO; LOPES, 2005). Na ausência de AIB, o sistema radicular pouco desenvolvido limita o fluxo de água-planta no meio de cultura (TYREE et al., 2003; SLOT; POOTER, 2007), podendo ocorrer perda de água pela planta a uma taxa superior à sua capacidade de absorção e transporte, diminuindo o potencial hídrico da folha, levando ao fechamento dos estômatos e redução da fotossíntese (COSTA; MARENCO, 2007). Assim, as microestacas podem não atingir taxas fotossintéticas expressivas, observado no tratamento sem AIB (controle), pois a clorofila *b*, pigmento que capta

radiação luminosa de comprimento de onda diferente da clorofila *a*, transfere a energia para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese (SCALON et al., 2003).

A diminuição da quantidade de clorofila *b* em relação à clorofila *a* estaria relacionada a uma menor proporção do fotossistema II, que é mais rico em clorofila *b* que *a*, em relação ao fotossistema I (CRITCHLEY, 1999). Um aparato fotossintético mais desenvolvido durante os últimos estádios da fase de enraizamento pode facilitar a aclimatização e aumentar a sobrevivência das plantas, uma vez que estimula a fotossíntese, (tal como a luz na faixa azul e vermelha), o aumento da cera epicuticular e a melhoria da relação hídrica, o que evita que a fotossíntese seja limitada sob condições adversas (SANTANA, et al. 2008).

## CONCLUSÃO

A imersão das sementes em 0,0; 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> independentemente do tempo, não afeta a germinação de *T. catharinensis in vitro*. As concentrações de 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> por 48h de pré-imersão reduziu a velocidade de germinação das sementes *T. catharinensis*.

A organogênese direta de brotações adventícias em explantes cotiledonares de *T. catharinensis* ocorreu sem a necessidade dos fitorreguladores de crescimento BAP e ANA. O número de brotos e folhas, bem como a massa fresca das brotações pode ser maximizado com a adição de BAP associada ao ANA no meio de cultura. Concentrações maiores de BAP x ANA (6,0 x 0,6 e 4,0 x 0,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), proporcionam aumento no comprimento de brotações.

O enraizamento de microestacas aos 30 dias após a inoculação é superior a 70% em todas as concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0). A suplementação de 1,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB ao meio de cultura proporciona maiores taxas de enraizamento (96,5 e 89,0%, respectivamente) e comprimento de raiz (15,96 e 15,60 cm, respectivamente). A presença do regulador de crescimento AIB incrementa todos os parâmetros analisados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, C. A. et al. Germinação e vigor de sementes de melancia com diferentes ploidias submetidas a tratamentos pré-germinativos. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.28, n.3, p.82-86 (2006).

- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**. Maryland, v. 24, p. 1-15, 1949.
- BORGES JÚNIOR, N. et al. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**. Viçosa, v.28, n.4, p.493-498, 2004.
- BORGES, S. R. et al. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**. Viçosa, v.35, n.3, p.425-434, 2011.
- BRONDANI, G. E. et al. Determinação do teor de carboidratos em minicepas de *Eucalyptus benthamii*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Gurupi, v.3, n.1, p.51-60, 2012.
- BRUM, G. R. et al. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.26, n.2, p.1403-9, 2002.
- CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.39, n.7, p.717-720, 2004.
- CHI, Y. M. et al. Pharmacological study on the novel antinociceptive agent, a novel monoterpene alkaloid from *Incarvillea sinensis*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. Japan, v. 28, p.1989-1991, 2005.
- COSTA, G. F.; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica**. Manaus, v.37, n.2, p.229-234, 2007.
- COSTA, G. M. DA, et al. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.40, n.5, p.1090-1096, 2010.
- CRITCHLEY, C. Molecular adaptation to irradiance: the dual functionality of photosystem II. In: SINGHAL, G.S. et al. (Ed) **Concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogenesis**. New Delhi: Narosa publishing House, 1999. p. 573-587.
- DEWIR Y. H. et al. Micropropagation and detection of important triterpenes *in vitro* and field grown plants of *Syzygium cordatum*. **Journal of Medicinal Plants Research**. Nigéria, v.5, p.3078-3083, 2011.
- DIAS, P. C. et al. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por miniestaquia. **Revista Árvore**. Viçosa, v.36, n.3, p.389-399, 2012.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**. Boa vista, v.6, n.2, p.36-41, 2008.
- FERREIRA, J. T. B., CORRÊA, A. G., VIEIRA, P. C. **Produtos Naturais no Controle de Insetos**. São Carlos: Editora da UFScar, p.176, 2001.

FORD, Y. Y. et al. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**. Netherlands, v.36, n.2, p.149-159, 2002.

GALDIANO JUNIOR, R. F. et al. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (*Orchidaceae*) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.42, n.5, p.801-807, 2012.

GEORGE E. F; DEBERGH P. C. Micropropagation: Uses and methods. In: George EF, Hall MA & De Klerk GJ (Eds.) **Plant propagation by tissue culture**. 3ª ed. The Background. Dordrecht, Springer. p.29-64, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB-EMBRAPA, 1998. p.183-260.

GUTIERREZ, I. E. M. de et al. Multiplicação *in vitro* de *Tapirira guianensis* Aubl. (*Anacardiaceae*). **Revista Ceres**. Viçosa, v.60, n.2, p.143-151. 2013.

HAQ, I. U. et al. Influence of microcutting sizes and IBA concentrations on in vitro rooting of olive cv. 'Dolce Agogia'. **Pakistan Journal Botany**. Pakistan, v.41, n.3, p.1213-1222, 2009.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 896p.

JARDIM L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**. Manaus, v.40, n.2, p.275-280, 2010.

KIELSE, P. et al. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rígida*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.4, p.1088-1094, 2009.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.

LIMA, J. F. de. et al. Germinação de sementes pré-embebidas e crescimento de plantas de *Artocarpus heterophyllus* Lam. **Scientia Agraria**. Curitiba, v.10, n.6, p.437-441, 2009.

LOPES DA SILVA, A. L. et al. Germinação *in vitro* de sementes e indução de calos em plântulas, cotilédones e anteras de porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Stand.) – Cucurbitaceae. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Gurupi, v.3, n.4, p.117-126, 2012.

MACEDO, C. E. C. et al. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas

obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal, v.25, n.3, p.501-504, 2003.

MAGGIO, A. et al. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. **Environmental and Experimental Botany**. França, v.59, p.276–282, 2007.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science** 2: p.176-177, 1962.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa: Ed. UFV. 2005. 451p.

MATOS, T. M. F., **Manejo agroecológico de manjeriço (*Ocimum basilicum*L.)**, 2011. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2011.

MONFORT, L. E. F. et al. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Paulínia, v.14, n.3, p.458-463, 2012.

MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.5, p.875-879, 2006.

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

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

NETO, M. P. et al. Germinação de sementes de jenipapeiro submetidas à pré-embebição em regulador e estimulante vegetal. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v.31, n.3, p.693-698, 2007.

NEVES, J. M. G. et al. Padronização do teste de germinação para sementes de Pinhão Manso. **Revista Caatinga**. Mossoró, v.22, n.4, p.76-80, 2009.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p.109-120, 2004. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br/revista/bio33/copaiba.pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2015.

OLIVEIRA, A. J. B. et al. *In vitro* multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). **Revista Árvore**. Viçosa, v.27, n.4, p.421-425, 2003.

PEREIRA, C. et al. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> + cosolvent. **Journal of Medicinal Food**. New York, v.8, p.533 – 538, 2005.

PEREIRA, P. S et al. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. **Química Nova**. São Paulo, v.31, n.1, p.20-24, 2008.

PIANA, M. et al. Phytochemical analysis and antioxidante capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Fruits and branches. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v.86, n.2, p.881-888, 2014.

POMPELLI, M. F. Germinação de *Dyckia encholirioides* var *encholirioides* (*Bromeliaceae*, *Pitcairnioideae*). **Floresta e Ambiente**. Seropédica, v.13, n.1 p.01-09, 2006.

QUINET, C. G. P.; ANDREATA, R. H. P. Estudo Taxonômico e Morfológico das Espécies de Apocynaceae Adans na Reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Pesquisa Botânica**. São Leopoldo, v.56, p.13-74, 2005.

REIS, E. S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**. Viçosa, v.55, n.3, p.160-7, 2008.

ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**. Viçosa, v.31, n.1, p.43-50, 2007.

SANTANA, et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 32, n. 2, p. 640-644, 2008.

SCALON, S. P. Q. et al. Armazenamento e tratamento pré-germinativos em sementes de jacarandá (*Jacaranda cuspidifolia* Mart.). **Revista Árvore**. Viçosa, v.30, n.2, p.529-536, 2006.

SCALON, S. P. Q. et al. Crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns sob condição de sombreamento. **Revista Árvore**. Viçosa, v.27, n.6, p.753-758, 2003.

SILVA, R. L. et al. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. **Agronomia Costarricense**. San Pedro de Montes de Oca, v.34, n.1, p.99-104, 2010.

SLOT, M.; POOTER, L. Diversity of tropical tree seedling responses to drought. **Biotropica**. Washington, v.39, p.683-690, 2007.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande Do Sul, Brasil**. São Carlos, SP, p. 350, 2006.

SOUSA, H. U. et al. Efeito do ácido giberélico sobre a germinação de porta-enxertos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.24, n.2, p.496-499, 2002.

STADEN J., ZAZIMALOVA E., GEORGE E. F. (2008) Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: George EF, Hall MA & De Klerk GJ (Eds.) **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>a</sup> ed. Dordrecht, Springer. p.205-226.

STENZEL, N. M. C. et al. Superação de dormência em sementes de atemóia e frutadão-conde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.305-308, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TYREE, M. T. et al. Desiccation tolerance of five tropical seedlings in Panama. Relationship to a field assessment of drought performance. **Plant Physiology**. Stanford. v.132, p.1439-1447, 2003.

VILLA, F. et al. Influência de substratos alternativos na aclimatização de orquídeas. **Revista Ceres**. Viçosa, v.54, n.316, p.501-505, 2007.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.29, n.3, p.582-589, 2005.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 272, 2009.

## 5 CAPÍTULO III

### **EMERGÊNCIA, VIGOR E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. EM FUNÇÃO DO SUBSTRATO**

## EMERGÊNCIA, VIGOR E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. EM FUNÇÃO DO SUBSTRATO

### RESUMO

Nativa do Rio Grande do Sul, *Tabernaemontana catharinensis* é uma espécie arbórea, pioneira, medindo de 3 a 8 m de altura, popularmente conhecida como “cobrina”, indicada para reflorestamentos mistos destinados à recuperação de mata nativa, rica em compostos fitoquímicos, suas folhas e cascas são utilizadas na medicina popular para diversos sintomas. Dada a relevância da espécie os objetivos deste trabalho foram avaliar a influência da composição de substratos sobre a emergência e parâmetros morfofisiológicos de crescimento de plântulas de cobrina. Após o beneficiamento das sementes, as mesmas foram submetidas à germinação nas seguintes composições de substratos: Mecplant<sup>®</sup> (substrato comercial), vermiculita de textura fina (V) e casca de arroz carbonizada (CAC), onde: T1) 100% Mecplant<sup>®</sup>; T2) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V; T3) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V; T4) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V T5) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC; T6) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% CAC; T7) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% CAC. As avaliações foram efetuadas aos 90 e 180 dias após a semeadura (DAS), aferindo a altura da parte aérea e o diâmetro do coleto. Aos 180 DAS, foram determinadas a massa seca de parte aérea, a massa seca de raízes, a massa seca total e os teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total, Chl *a/b* e carotenóides. A emergência e os parâmetros morfofisiológicos de crescimento foram afetados negativamente pela composição exclusiva de Mecplant<sup>®</sup>. O substrato comercial associado ao material inerte vermiculita (T3 e T4) proporcionaram maior expressão do vigor das sementes e maior crescimento de plântulas, evidenciando ser mais adequado para a formação de mudas. Teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides não são influenciados pelos substratos formulados. A relação da clorofila *a/b* é mais elevada nos tratamentos T2 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V), T4 (25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V) e T5 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC).

**Palavras-chave:** Cobrina. Planta Nativa. Biomassa. Pigmentos Fotossintéticos.

## EMERGENCY, VIGOR AND *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. SEEDLINGS DEVELOPMENT DEPENDING ON SUBSTRATE

### ABSTRACT

*Tabernaemontana catharinensis* is native to Rio Grande do Sul and it is an arboreal pioneer species, measuring from 3 to 8 meters high. It is popularly known as *cobrina* and it is indicated for mixed reforestation for the recovery of native forest, since it is rich in phytochemicals compounds, their leaves and barks are used in folk medicine for numerous symptoms. Given the importance of the species, the aims of this study were to evaluate the influence of substrate composition on the emergence and physiological growth of *cobrina* seedlings. After the processing of the seeds, they were submitted to germination in the following substrates compositions: Mecplant<sup>®</sup> (commercial substrate), fine texture vermiculite (V) and carbonized rice husk (CRH) where: T1) 100% Mecplant<sup>®</sup>; T2) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V; T3) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V; T4) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V T5) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CRH; T6) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% CRH; T7) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% CRH. The evaluations were made at 90 and 180 days after sowing (DAS), by checking the height of the area and stem diameter. At 180 DAS, the dry mass of shoot, dry root mass, total dry weight and the contents of chlorophyll a, b, total chlorophyll, Chl a/b and carotenoid were determined. The emergence and growth morphophysiological parameters were negatively affected by the unique composition of Mecplant<sup>®</sup>. The commercial substrate associated with the vermiculite inert material (T3 and T4) presented higher expression of seed vigor and high seedling growth, showing to be more appropriate for the formation of seedlings. Levels of total chlorophyll a, b, and carotenoid are not influenced by the substrates. The ratio of chlorophyll a/b is higher in the treatments T2 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V), T4 (25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V) and T5 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CRH).

**Keywords:** Cobrina. Native Plant. Biomass. Photosynthetic Pigments.

## INTRODUÇÃO

Por ser altamente rentável a diversos países, o setor florestal destacou-se nas últimas décadas (BASSO et al., 2011) pela procura por espécies arbóreas nativas visando à utilização em programas de reflorestamento, projetos de arborização urbana e reconstituição de áreas para preservação vegetal (SCALON et al., 2006). Entretanto, diferentemente de plantas de cultivo comercial, há grande lacuna quanto ao conhecimento sobre o potencial germinativo, crescimento e desenvolvimento de plântulas de espécies arbóreas nativas cultivadas em diferentes composições de substratos (AFONSO et al., 2012).

Nesse sentido, a espécie *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae) conhecida popularmente como cobrina, é uma planta nativa do Brasil, pioneira e dispersa em várias formações florestais. *T. catharinensis* é uma árvore de até quatro metros de altura, com folhas simples, com pecíolo de 1 a 12 mm de comprimento, filotaxia oposta e frutos deiscentes (PEREIRA et al., 2008; LORENZI, 2009). Esta espécie é recomendada para reflorestamento de áreas degradadas, de preservação permanente e para plantios mistos destinados à recuperação de mata nativa (SOBRAL et al., 2006). É rica em compostos fitoquímicos como flavonoides, saponinas, terpenos, alcaloides e esteroides (CHI et al., 2005). Possui capacidade bioinseticida por conter classes de fitoquímicos como alcaloides e terpenos (FERREIRA et al., 2001). Seus ramos demonstram propriedades antioxidantes, revelando além da rutina, um glicosídeo de quercetina e ácido clorogênico (PIANA et al., 2014). Suas folhas e cascas são utilizados na medicina popular como antídoto para picadas de cobra, para aliviar dor de dente, tratamento de feridas, herpes e tumores (PEREIRA et al., 2005).

Dada a importância da espécie, a busca por mecanismos para manutenção e produção de um grande número de mudas, passa pelo estudo do crescimento vegetativo da plântula jovem, para a obtenção de plantas de alta qualidade morfofisiológicas, sendo que vários indicadores fitotécnicos podem ser utilizados para esta finalidade como altura da plântula, diâmetro do caule, área foliar e a biomassa resultante, assim como o conteúdo de clorofilas, característica fisiológica utilizada para estimar o potencial fotossintético das plantas (ERISMANN et al., 2006).

Com isso a composição do substrato pode interferir não só no potencial germinativo das sementes, mas também nas condições ideais para suporte e desenvolvimento das plântulas e na eficiência do sistema fotossintético (COELHO et al., 2006), permitindo o estabelecimento vegetal, garantindo o crescimento radicular e da parte aérea, motivo pelo qual deve apresentar porosidade, capacidade de retenção de água e fornecimento de nutrientes adequados (STURION et al., 2000). Dificuldades a respeito da melhor formulação do substrato levam ao estudo de substratos alternativos, pois dificilmente um único material será capaz de atender todas às exigências da espécie a ser propagada e, por essa razão, materiais que melhorem as características físicas são incorporados aos substratos.

A escolha dos materiais a serem utilizados para uma formulação adequada do substrato deve considerar a espécie, a disponibilidade e o custo do material (CUNHA et al., 2005; MESQUITA et al., 2012). Diferentes materiais ou composições de substratos possuem efeitos sobre a emergência de plântulas, fase crítica do ciclo de desenvolvimento vegetal e que constitui estágio decisivo para o adequado estabelecimento dos indivíduos a campo, devido à elevada vulnerabilidade a estresses ambientais (CASTRO et al., 2004). Tal efeito reflete quantitativamente na produção de biomassa e, assim, sobre o crescimento inicial das plântulas e na qualidade da muda produzida.

Assim, este trabalho objetivou avaliar a influência da composição de substratos na emergência e nos parâmetros morfofisiológicos de crescimento de plântulas de *Tabernaemontana catharinensis*.

## **METODOLOGIA**

O trabalho foi realizado em casa de vegetação disposta no sentido norte-sul, localizada na Universidade Federal de Santa Maria (29° 42' 56"S e 53° 43' 12"O), pertencente ao Departamento de Biologia. Os frutos de cobra ( *Tabernaemontana catharinensis*) foram coletados no terço médio lateral de cinco matrizes com cerca de 4 m de altura e localizadas em remanescente vegetal, na região Noroeste do Rio Grande do Sul, no mês de maio de 2015. Após a retirada das sementes, estas foram submetidas ao processo de secagem natural sobre bandeja com fundo de tela por cinco dias e então dispostas para germinar em bandejas de isopor com 72 células individuais, com capacidade de 121,2 cm<sup>3</sup> de substrato, na profundidade de 1 cm e mantidas em casa de vegetação com temperatura de 25 ± 3 °C e irrigações diárias.

Os tratamentos constaram de composições (v/v) dos substratos Mecplant<sup>®</sup> (substrato comercial a base de casca de pinus bioestabilizada), vermiculita de textura fina (V) e casca de arroz carbonizada (CAC), onde: T1) 100% Mecplant<sup>®</sup>; T2) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V; T3) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V; T4) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V; T5) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC; T6) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% CAC; T7) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% CAC. Todos os tratamentos receberam 8 g L<sup>-1</sup> de Osmocote<sup>®</sup> (adubação NPK, na formulação 15-9-12), com período de liberação de cinco a seis meses, conforme recomendação do fabricante.

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de 18 sementes, totalizando 72 sementes por tratamento. As avaliações foram realizadas a cada três dias, até a estabilização da emergência em cada tratamento. Os parâmetros avaliados foram a percentagem de emergência (%E), sendo considerada emergida quando os cotilédones estavam totalmente livres acima do solo (LABOURIAU; VALADARES, 1976), e o índice de velocidade de emergência (IVE) conforme MAGUIRE (1962). Com a posterior estabilização da emergência as plântulas foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 700 mL de substrato. Aos 90 e 180 DAS, em três amostras por repetição de cada tratamento, foram medidas a altura (A) a partir do colo da plântula ao ápice e comprimento da raiz principal (CR), ambos por meio de régua milimetrada; diâmetro do colo (DC) por meio de paquímetro digital e a área foliar através do integrador de área foliar (AM 300).

Aos 180 DAS quatro amostras por repetição de tratamento, foram separadas em raízes e parte aérea para obtenção da massa seca, sendo as raízes lavadas em água corrente, sobre peneira de malha fina para a retirada do substrato. O material foi acondicionado em envelopes de papel pardo e colocado para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C, por 72 horas. A massa seca da parte aérea (MS<sub>PA</sub>), de raízes (MS<sub>RAIZ</sub>) e total (MS<sub>TOTAL</sub>) representada pela soma da MS<sub>PA</sub> e MS<sub>RAIZ</sub>, foram obtidas através de balança analítica e os resultados expressos em gramas (g). A relação raiz/parte aérea foi obtida através da razão entre MS<sub>RAIZ</sub> e MS<sub>PA</sub> e o índice de qualidade de Dickson (IQD) determinado segundo DICKSON et al. (1960), sendo  $IQD = MS_{TOTAL} / (RAD + MS_{PA} / MS_{RAIZ})$  e RAD refere-se à razão da altura da parte aérea e o diâmetro do coleto das mudas.

A determinação dos teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenoides foi efetuada ao final do experimento (180 DAS), utilizando-se quatro amostras de folhas

maduras do terço central da parte aérea de quatro mudas provenientes de cada composição do substrato. O material vegetal foi macerado em acetona 80% e a quantificação dos teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenóides ( $\text{mg g}^{-1}$  MF), foi obtida por espectrofotometria de emissão a 663 nm, 645 nm e 480 nm, conforme metodologia de Arnon (1949).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos substratos comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro, utilizando o aplicativo Sisvar (FERREIRA, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

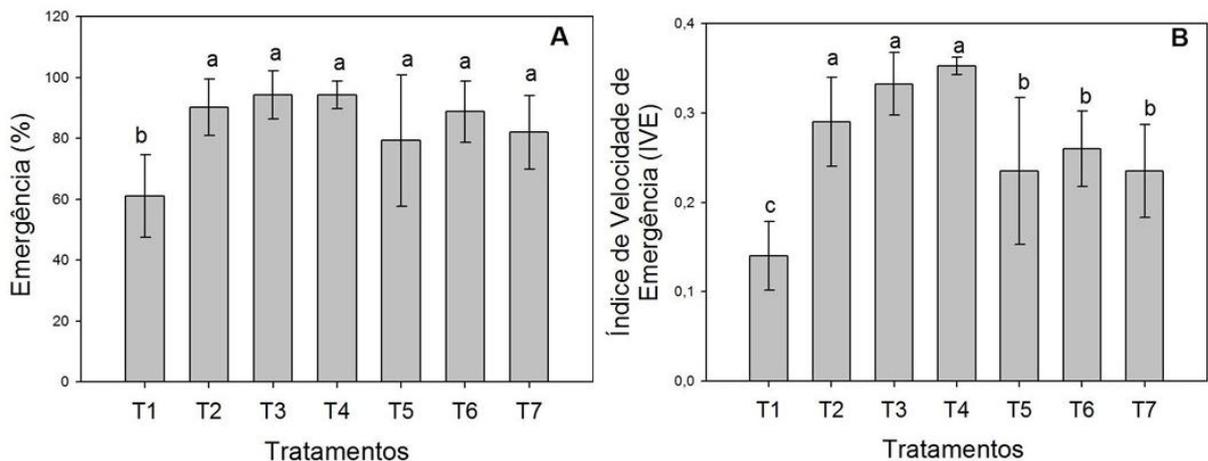
Houve efeito significativo das diferentes composições de substratos sobre a emergência e IVE de plântulas de cobrina (Figura 1). Maiores percentagens de emergência foram observadas nos tratamentos contendo vermiculita e casca de arroz carbonizada (T2 ao T7), comparado com o tratamento contendo somente substrato comercial Mecplant<sup>®</sup> (T1). Os tratamentos formulados com substratos Mecplant<sup>®</sup> mais vermiculita (T2) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V; T3) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V; e T4) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V) apresentaram maior velocidade de emergência, diferindo significativamente dos tratamentos compostos por substratos Mecplant<sup>®</sup> isolado (T1) e com casca de arroz carbonizada, 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC (T5), 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% CAC (T6), 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% CAC (T7).

O substrato influencia diretamente a emergência, em função de sua estrutura, aeração, capacidade de retenção de água, propensão à infestação por patógenos, dentre outros, podendo favorecer ou prejudicar a germinação das sementes. Além disso, constitui o suporte físico no qual a semente é colocada e tem a função de manter as condições adequadas para a germinação e o desenvolvimento das plântulas (MARTINS et al., 2012). De modo geral, não há um substrato isolado que satisfaça todas as condições necessárias e garanta o crescimento satisfatório de espécies florestais. Desta forma, é sempre aconselhável utilizar componentes de um substrato em forma de mistura, já que os mesmos podem apresentar características indesejáveis à planta, quando usados isoladamente (CALDEIRA et al., 2011).

A necessidade de se obter uma formulação de substrato que promova produção em quantidade e qualidade para mudas de espécies florestais nativas deve-se, principalmente, à importância de se obter mudas de alta qualidade para povoamentos florestais. O uso da vermiculita como substrato tem sido comumente

utilizado para a produção de mudas de espécies florestais em função de algumas características como fácil obtenção, uniformidade na composição química e granulométrica, porosidade, capacidade de retenção de água e baixa densidade. A vermiculita tem sido indicada para uso em conjunto com outro material, preferencialmente de origem orgânica, com a finalidade de promover maior aeração e porosidade a outros substratos menos porosos, pois a porosidade permite o movimento de água e ar, favorecendo a germinação, a qual necessita apenas de hidratação e aeração da semente para que se procedam às reações enzimáticas (NOGUEIRA et al., 2003; GOMES; PAIVA, 2006; MARTINS et al., 2009).

Figura 1 – Percentagem de emergência (A) e Índice de velocidade de emergência (B) de plântulas de cobrina (*Tabernaemontana catharinensis*) em diferentes substratos.



\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1) 100% Mecplant<sup>®</sup>; T2) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V; T3) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V; T4) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V; T5) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC; T6) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% CAC; T7) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% CAC.

A adição de casca de arroz carbonizada ao substrato comercial (Mecplant<sup>®</sup>) foi significativamente ( $P < 0,05$ ) menos eficiente do que a vermiculita em relação a velocidade de emergência, porém superior ao uso isolado do substrato Mecplant<sup>®</sup> para as variáveis emergência e IVE. A casca de arroz pode ser utilizada como substrato tanto na forma natural quanto carbonizada, misturada a outros materiais. Apresenta boa drenagem, rápida e eficiente, proporcionando boa oxigenação, elevado espaço de aeração ao substrato, resistência à decomposição, isenta de plantas daninhas e patógenos, relativa estabilidade de estrutura, baixa densidade e pH próximo à neutralidade melhorando as propriedades físicas do substrato final (SOARES et al., 2012; FREITAS, et al., 2013).

O substrato deve proporcionar eficiência e velocidade na emergência e uniformidade de plântulas, contribuindo para a redução dos custos de produção de mudas no viveiro, diminuindo a necessidade de mão de obra, irrigação e cuidados por mais tempo. Quanto mais tempo a plântula permanecer nos estádios iniciais de desenvolvimento maior a exposição às condições adversas do ambiente. A emergência lenta como observada no tratamento T1 pode estar relacionada a uma maior compactação e a baixa capacidade de retenção de água do substrato interferindo no suprimento hídrico durante a fase da embebição, onde tecidos não toleram a dessecação (ELIAS et al., 2006; GUEDES et al., 2010).

Resultados de altura, diâmetro do colo, comprimento da maior raiz e área foliar de mudas de cobrina são apresentados na Tabela 1. A altura e a área foliar foram maiores nos tratamentos T3 e T4 aos 90 e 180 DAS, comparado com os demais tratamentos. No uso exclusivo de substrato Mecplant<sup>®</sup>, observou-se menor altura e área foliar aos 90 e 180 DAS. Aos 90 DAS, os tratamentos T2, T3, T4 e T5 proporcionaram maior diâmetro do colo e comprimento da maior raiz (Tabela 1) de plantas de *T. catharinensis*, comparado com os demais tratamentos. Por outro lado, aos 180 DAS não houve diferença significativa entre os tratamentos para comprimento da maior raiz, enquanto os tratamentos T3 e T4 proporcionaram maior diâmetro do colo.

**Tabela 1** – Altura (A), diâmetro do colo (DC), comprimento da maior raiz (CR) e área foliar (AF) de mudas de cobrina (*Tabernaemontana catharinensis* A. DC.) avaliadas aos 90 e 180 dias após a semeadura, cultivadas em diferentes substratos.

Tratamento	Dias após a semeadura (D.A.S)							
	90				180			
	A (cm)	DC (mm)	CR (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )	A (cm)	DC (mm)	CR (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )
T1	2,79 c	1,56 b	6,61 b	8,8 b	12,13 c	2,75 c	19,8 a	132,0 c
T2	3,83 b	1,82 a	10,25 a	28,0 b	16,60 b	3,53 b	18,3 a	181,3 c
T3	4,94 a	2,03 a	9,41 a	41,0 a	21,75 a	4,25 a	21,5 a	325,3 a
T4	5,13 a	1,97 a	10,14 a	43,3 a	22,75 a	4,31 a	26,0 a	380,5 a
T5	3,66 b	1,82 a	9,53 a	19,7 b	17,38 b	3,65 b	21,3 a	239,6 b
T6	3,86 b	1,56 b	7,34 b	19,1 b	17,38 b	3,38 b	19,8 a	254,6 b
T7	3,81 b	1,62 b	6,43 b	22,6 b	16,25 b	3,41 b	20,1 a	198,3 c

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1) 100% Mecplant<sup>®</sup>; T2) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V; T3) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V; T4) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V; T5) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC; T6) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% CAC; T7) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% CAC.

O desempenho do crescimento das plântulas é uma informação bastante relevante para a avaliação da capacidade de espécies vegetais em expressar o seu máximo potencial produtivo ou de se adaptar a novas condições do ambiente (BARBOSA et al., 2013). Embora a vermiculita seja um material inerte, algumas de suas características aliadas com a utilização de uma fonte de adubação como o Osmocote<sup>®</sup> demonstrou maior qualidade nas mudas produzidas. Marana et al. (2008) comentaram que, durante o período de cinco meses necessário à formação das plântulas, os nutrientes devem ser disponibilizados de acordo com a necessidade das mesmas. O uso de um adubo com liberação lenta atende a essa questão, podendo assim servir para a produção de mudas com qualidade necessária desejável.

A altura e o diâmetro do colo são avaliados para indicar a capacidade de sobrevivência das mudas no campo. Para espécies florestais, mudas de qualidade devem apresentar valores adequados para altura que estão entre 20 e 35 cm e do diâmetro do colo entre 5 e 10 mm (GONÇALVES et al., 2000). O diâmetro do colo além de refletir o acúmulo de reservas, assegura maior resistência e melhor fixação no solo. Mudas que apresentam diâmetro do colo pequeno e alturas elevadas são consideradas de qualidade inferior às com menores alturas e com maior diâmetro do colo. Plantas com diâmetro do colo menor apresentam desvantagem devido à dificuldade para se manterem eretas após o plantio e o tombamento pode resultar em morte ou deformações, comprometendo o valor silvicultural da planta (ARTUR et al., 2007; REIS et al., 2008). A taxa de crescimento do diâmetro do caule depende da atividade cambial que, por sua vez, é estimulada por carboidratos e por hormônios translocados das regiões apicais; sendo, portanto, um bom indicador da assimilação líquida (PAIVA et al., 2003).

Substratos compostos por 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V (T4) e 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V (T3), proporcionaram uma maior área foliar aos 90 e 180 DAS. A área foliar se correlaciona diretamente com a área da superfície fotossintetizante útil, maximizando a captação da energia luminosa e conversão em energia química, refletindo nas taxas de crescimento, espessura foliar e partição de assimilados para as demais partes estruturais (BARBIERI JUNIOR et al., 2007; BARBOSA et al., 2013).

Quando observado os resultados para o comprimento da maior raiz (CR), a diferença significativa demonstrada entre os tratamentos aos 90 DAS não se

mantêm aos 180 DAS, isso possivelmente pode ter ocorrido devido à restrição de volume explorável de substrato imposto pelo recipiente na produção das mudas, interrompendo a expansão em profundidade do sistema radicular. Cabe ressaltar que as raízes, além de serem responsáveis pela absorção de água e pela sustentação da planta, do ponto de vista nutricional, devem ser eficientes na absorção e utilização de nutrientes. Para a formação de biomassa, um sistema radicular bem desenvolvido em profundidade possibilita à planta resistir bem aos períodos de seca, desenvolvendo potencial produtivo e capacidade de adaptação às condições adversas do ambiente (SALTON et al., 2008; BEHLING et al., 2014).

Aos 180 DAS, a massa seca de parte aérea (2,19 g) e raiz (1,71 g) na composição exclusiva de Mecplant<sup>®</sup> foram inferiores às demais composições, ocorrendo conseqüentemente a redução da massa seca total (3,90 g) (Tabela 2). Estes parâmetros foram maiores em mudas crescidas na composição T3 e T4, diferindo dos demais tratamentos. Os tratamentos constituídos de Mecplant<sup>®</sup> e CAC (T5, T6 e T7) e o T2 não diferiram entre si quando analisadas a massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz e a massa seca total das mudas. A relação  $MS_{RAIZ}/MS_{PA}$  não mostrou diferença entre as composições de substratos. O índice de qualidade de Dickson (IQD) apresentou os maiores valores nos tratamentos T4, T3, T5 (0,879; 0,863; 0,806, respectivamente), não diferindo entre si.

**Tabela 2** – Massa seca da parte aérea ( $MS_{PA}$ ), massa seca da raiz ( $MS_{RAIZ}$ ), massa seca total ( $MS_{TOTAL}$ ), relação massa seca da raiz e parte aérea ( $MS_{RAIZ}/MS_{PA}$ ) e índice de qualidade de Dickson (IQD) de mudas de cobra ( *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.), aos 180 dias após a sementeira, cultivadas em diferentes substratos.

Tratamento	$MS_{PA}$ (g)	$MS_{Raiz}$ (g)	$MS_{TOTAL}$ (g)	$MS_{Raiz}/MS_{PA}$	IQD
T1	2,19 c	1,71 c	3,90 c	0,785 a	0,688 b
T2	2,51 b	1,97 b	4,47 b	0,793 a	0,746 b
T3	3,22 a	2,37 a	5,59 a	0,738 a	0,863 a
T4	3,35 a	2,47 a	5,81 a	0,738 a	0,879 a
T5	2,77 b	2,12 b	4,89 b	0,765 a	0,806 a
T6	2,71 b	1,99 b	4,70 b	0,735 a	0,723 b
T7	2,62 b	2,01 b	4,63 b	0,770 a	0,763 b

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1) 100% Mecplant<sup>®</sup>; T2) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V; T3) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V; T4) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V; T5) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC; T6) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% CAC; T7) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% CAC.

O baixo investimento em biomassa na composição exclusiva Mecplant<sup>®</sup>, resultou num processo de crescimento lento da planta em altura e expansão foliar. Segundo Marana et al. (2008), isso indica que a muda não teve bom desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular. A massa seca da parte aérea indica a rusticidade e correlaciona-se diretamente com a sobrevivência e desempenho inicial das mudas após o plantio. Maior  $MS_{PA}$  pode constituir reservatório temporário de assimilados, pois estes compostos, ao serem alocados no caule, podem ser translocados e alocados para a formação de folhas, permitindo maior área de captação de energia radiante e contribuindo para a elevação da massa seca total (GOMES; PAIVA, 2006; MARENCO; LOPES, 2005).

Restrições no volume radicular podem prejudicar a adaptação das mudas em local definitivo, pois dificulta a absorção de água e a sustentação da muda no solo (LIMA et al., 2008). Um sistema radicular representativo é relevante em função da necessidade das mudas absorverem maiores quantidades de água, devido uma maior transpiração. Raízes com maior massa seca possuem tendência a apresentar maior número de ápices radiculares, região da raiz que mais possui eficiência na absorção e transporte de água e nutrientes e, principalmente, na produção de fitormônios (REIS et al., 1989; AGUIAR et al., 2011). Acúmulo de massa seca no sistema radicular, em detrimento do acúmulo de assimilados na parte aérea, segundo Carvalho et al. (2006) é uma tendência que permite maior absorção de água e nutrientes, sendo estratégia da planta para garantir maiores taxas de fotossíntese e transpiração, além da planta ter maior capacidade de suportar deficiências hídricas.

Caldeira et al. (2008), relatam que a relação  $MS_{RAIZ}/MS_{PA}$  deve ser 1:2, ao analisarem a massa seca total e a relação entre massa seca de raiz e parte aérea, na produção de mudas de aroeira-vermelha. Saidelles et al. (2009) sugeriram que a parte aérea deve ser similar à raiz, em razão de possíveis limitações quanto à absorção de água para a parte aérea. Isto foi observado por Afonso et al. (2012) quando trabalhou com diferentes composições de substratos na produção de mudas de *Enterolobium contortisiliquum*, sendo que esta relação se manteve em 1:1.

O IQD é um bom indicador da qualidade das mudas, mencionado como uma promissora medida morfológica integrada, pois no seu cálculo são considerados a robustez e o equilíbrio da distribuição da biomassa na muda, ponderando-se os resultados de vários parâmetros importantes (altura, diâmetro do colo, massa seca

da parte área, raiz e total) empregados para a avaliação da qualidade (FONSECA et al., 2002). Hunt (1990) adotou o valor de 0,20 como o mínimo para o IQD, na avaliação de mudas de *Pinus*. Porém, não há na literatura valores de referência quanto à qualidade para as diferentes espécies arbóreas nativas, o que dificulta a análise dos índices obtidos (FERRAZ; ENGEL, 2011). Freitas et al. (2012) observaram que as plantas submetidas a 50% de sombra e pleno sol apresentaram valores de IQD de 0,68 e 0,76 respectivamente, mostrando que as mudas de *Sclerolobium paniculatum* (angá) produzidas nesses dois níveis de sombreamento apresentavam qualidade para plantio. Em mudas de aroeira-vermelha aos 90 DAS o IQD atingiu valores de 0,73 em substrato com mistura de esterco de curral peneirado, casca de arroz carbonizada, vermiculita textura média e terra de subsolo peneirada, numa proporção de 4:3:2:1 em volume, respectivamente (JOSÉ et al., 2005).

Os teores de clorofila *a*, *b* e total não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3). Para a relação clorofila *a/b*, menores valores foram encontrados para as mudas crescidas em composição com Mecplant<sup>®</sup> mais adição CAC nas proporções 50% (T6) e 75% (T7), e na mistura intermediária com vermiculita, 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V (T3). As composições de substratos não interferiram significativamente nos teores de carotenóides.

**Tabela 3** – Valores médios da clorofila *a* (Chl*a*), *b* (Chl*b*), *total* (Chl*total*), relação entre clorofila *a* e *b* (Chl *a/b*) e carotenóides em mudas de cobrina (*Tabernaemontana catharinensis* A. DC.) aos 180 dias após semeadura, cultivadas em diferentes substratos. MF refere-se à matéria fresca.

Tratamento	Chl <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>total</i> (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>a/b</i>	Carotenóides (mg g <sup>-1</sup> MF)
T1	1,25 a	0,28 a	1,53 a	4,52 b	0,39 a
T2	1,15 a	0,24 a	1,38 a	4,96 a	0,33 a
T3	1,36 a	0,31 a	1,67 a	4,39 b	0,38 a
T4	1,43 a	0,29 a	1,72 a	4,90 a	0,38 a
T5	1,43 a	0,30 a	1,73 a	4,90 a	0,40 a
T6	1,45 a	0,33 a	1,78 a	4,51 b	0,40 a
T7	0,93 a	0,22 a	1,15 a	4,19 b	0,28 a

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. T1) 100% Mecplant<sup>®</sup>; T2) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V; T3) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V; T4) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V; T5) 75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC; T6) 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% CAC; T7) 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% CAC.

Um dos fatores mais importantes para o crescimento e adaptação das plantas aos diferentes ambientes é o conteúdo de clorofila (RÊGO; POSSAMAI, 2008; PACHECO; PAULILO, 2009). É possível que a baixa variação na intensidade de radiação devido as condições do experimento em casa de vegetação, conjuntamente com os substratos testados não influenciaram estatisticamente os valores médios das clorofilas *a*, *b*, total e dos carotenóides. A menor razão clorofila *a/b*, provoca um aumento quantitativo do fotossistema II, o qual é mais rico em clorofila *b* que *a* (CRITCHLEY, 1999).

De acordo com Scalon et al. (2003), o aumento da proporção de clorofila *a/b*, como observado nos tratamentos T2, T4 e T5, é uma característica importante, pois este pigmento clorofiliano (chl *b*) capta energia de outros comprimentos de onda e transfere para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese. Essa maior concentração de clorofila *b*, provavelmente atue como um sistema de aclimatização das plantas ao ambiente no sentido de maximizar a absorção da radiação incidente (CHOW et al., 1990).

Os carotenóides durante a fotossíntese podem desempenhar duas funções distintas: absorção de luz nos complexos de captação de luz atuando como pigmentos acessórios e exercendo ação fotoprotetora do aparato fotoquímico, prevenindo danos foto-oxidativos às moléculas de clorofila (RAVEN et al., 2007). Os baixos teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila total e carotenóides), observados nas plantas de *T. catharinensis* cultivadas com 25% de Mecplant<sup>®</sup> + 75% de CAC (T7), podem indicar a interferência deste substrato na produção dos pigmentos bem como na eficiência fotossintética (GOMES et al., 2008). Esta influência pode ser caracterizada pela disponibilização de nutrientes e água para a planta. O mesmo foi evidenciado por Grave et al. (2007) em plântulas de *Luehea divaricata*, cultivadas em substrato casca de arroz carbonizada. Segundo estes autores, a CAC apresenta limitações na disponibilidade de água, conseqüentemente afetando a translocação de nutrientes. Além disso, segundo Medeiro et al. (2001) a CAC pode apresentar dificuldades na conservação de uma umidade homogênea quando utilizada como substrato único ou em concentrações elevadas quando em mistura e em proporções moderadas. Como a fotossíntese depende da área foliar e da disponibilidade e capacidade de retenção de água, o rendimento das mudas será maior quanto mais rápido a planta atingir o índice de área foliar máximo, quanto mais

tempo a folha permanecer ativa e quanto menos tempo a planta ficar exposta a restrição hídrica (FREITAS et al., 2013).

## CONCLUSÃO

A utilização isolada de substrato comercial 100% Mecplant<sup>®</sup> (T1) proporciona menor emergência e IVG de plântulas e afeta negativamente as características de crescimento.

O substrato comercial associado ao material inerte vermiculita nas formulações 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V (T3) e 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V (T4) propicia maior expressão do vigor de sementes e maior crescimento de plântulas, evidenciando ser mais adequado para a formação de mudas de cobrina dentre os estudados.

Teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides não são influenciados pelos substratos formulados. A relação da clorofila *a/b* é mais elevada nos tratamentos T2 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V), T4 (25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V) e T5 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, M. V. et al. Composição do substrato, vigor e parâmetros fisiológicos de mudas de timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (vell.) morong). **Revista Árvore**. Viçosa, v.36, n.6, p.1019-1026, 2012.
- AGUIAR, F. F. A. et al. Crescimento de mudas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), submetidas a cinco níveis de sombreamento. **Revista Ceres**. Lavras, v.58, n.6, p.729-734, 2011.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**. Maryland, v. 24, p. 1-15, 1949.
- ARTUR, A. G. et al. Esterco bovino e calagem para formação de mudas de guanandi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.42, n.6, p.843-850, 2007.
- BARBIERI JUNIOR, D. et al. Análise de crescimento de *Hymenaea courbaril* L. sob efeito da inoculação micorrízica e adubação fosfatada. **Revista Ciências Agro-Ambientais**. Alta Floresta, v.5, n.1, p.1-15, 2007.
- BARBOSA M. L. et al. Crescimento Inicial de Espécies Ocorrentes no Semiárido Brasileiro: Biomassa, Biometria e Análise Morfogênica. **Revista Brasileira de Geografia Física**. Recife, v.6, n.3, p.522-539, 2013.

- BASSO, V. M. et al. Influência da certificação florestal no cumprimento da legislação ambiental e trabalhista na região amazônica. **Acta Amazonica**. Manaus, v.41, n.1, p.69-76, 2011.
- BEHLING, M. et al. Eficiência de utilização de nutrientes para formação de raízes finas e médias em povoamento de teca. **Revista Árvore**. Viçosa, v.38, n.5, p.837-846, 2014.
- CALDEIRA, M. V. W. et al. Composto orgânico na produção de mudas de aroeira-vermelha. **Scientia Agrária**. v.9, n.1, p.27-33, 2008.
- CALDEIRA, M. V. W. et al. Crescimento de mudas de *Eucalyptus saligna* Smith em função de diferentes doses de vermicomposto. **Revista Floresta**. Curitiba, v.28, n.1/2, p.19-30, 2000.
- CARVALHO, N. O. S. et al. Crescimento inicial de plantas de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) em diferentes níveis de luminosidade. **Revista Árvore**. Viçosa, v.30, n.3, p.351-357, 2006.
- CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORDT, K. W. M. **Embebição e reativação do metabolismo**. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, p. 149-162, 2004.
- CHI, Y. M. et al. Pharmacological study on the novel antinociceptive agent, a novel monoterpene alkaloid from *Incarvillea sinensis*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. Japan, v. 28, p.1989-1991, 2005.
- CHOW, W. S.; MELIS, A.; ANDERSON, J. M. Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Washington, v.87, p.7502-7506, 1990.
- COELHO, R. R. P. et al. Influência de substratos na formação de mudas de guapuruvu (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake). **Revista Ciência Agrônômica**. Fortaleza, v.37, n. 2, p.149- 152, 2006.
- CRITCHLEY, C. Molecular adaptation to irradiance: the dual functionality of photosystem II. In: Singhal, G. S.; Renger, G.; Sopory, S. K.; Irrgang Govindjee, K. (Eds.). **Concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogenesis**. New Delhi: Narosa Publishing House, 1999. p. 573-587.
- CUNHA, A. O. et al. Efeitos de substratos e das dimensões dos recipientes na qualidade das mudas de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex D.C.) Standl. **Revista Árvore**. Viçosa, v.29, n.4, p.507-516, 2005.
- DICKSON, A. et al. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, n. 1, p. 10-13, 1960.

ELIAS, M. E. A.; FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Emergência de plântulas de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) em função da posição de sementeira. **Acta Amazonica**. Manaus, v.36, n.3, p.385-388, 2006.

ERISMANN, N. M.; MACHADO, E. C.; GODOY, I. J. Capacidade fotossintética de genótipos de amendoim em ambiente natural e controlado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.41, n.7, p.1099-1108, 2006.

FALQUETO, A. R. et al. Physiological analysis of leaf senescence of two rice cultivars with different yield potential. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.44, n.7, p.695-700, 2009.

FERRAZ, A. V. ENGEL, V. L. Efeito do tamanho de tubetes na qualidade de mudas de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang.), Ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Sandl.) e Guarucaia (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan). **Revista Árvore**. Viçosa, v.35, n.3, p.413-423, 2011.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**. v.6, n.2, p.36-41, 2008.

FERREIRA, J. T. B., CORRÊA, A. G., VIEIRA, P. C. **Produtos Naturais no Controle de Insetos**. São Carlos: Editora da UFScar, p.176, 2001.

FONSECA, E. P. et al. Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume, produzidas sob diferentes períodos de sombreamento. **Revista Árvore**. Viçosa, v.26, n.4, p.515-523, 2002.

FREITAS, G. A. et al. Influência do sombreamento na qualidade de mudas de *Sclerolobium paniculatum* Vogel para recuperação de área degradada. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Gurupi, v.3, n.3, p.5-12, 2012.

FREITAS, G. A. et al. Produção de mudas de alface em função de diferentes combinações de substratos. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, v.44, n.1, p.159-166, 2013.

FREITAS, G. A. et al. Produção de mudas de alface sob diferentes substratos e proporções de casca de arroz carbonizada. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Gurupi, v.4, n.3, p.260-268, 2013.

GOMES, I. A. C. et al. Alterações morfofisiológicas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. Oeiras sob influência do sombreamento por *Acacia mangium* Willd. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.1, p.109-115, 2008.

GOMES, J. M.; PAIVA, H. N. **Viveiros Florestais: propagação assexuada**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2006.

GONÇALVES, J.L.M. et al. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p.310-350.

GRAVE, F. et al. Crescimento de plantas jovens de açoita-cavalo em quatro diferentes substratos. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v.17, n.4, p.289-298, 2007.

GUEDES, R. S. et al. Emergência e vigor de plântulas de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith em função da posição e da profundidade de semeadura. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.31, n.4, p.843-850, 2010.

HUNT, G. A. Effect of styroblock design and cooper treatment on morphology of conifer seedlings. In: TARGET SEEDLINGS SYMPOSIUM, MEETING OF THE WESTERN FOREST NURSERY ASSOCIATIONS, Roseburg, 1990. **Proceedings...**Fort Collins: United States Department of Agriculture, Forest Service, 1990. p.218-222. (RM-GTR-200).

JOSÉ, A. C.; DAVIDE, A. C.; OLIVEIRA, S. L. Produção de mudas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para recuperação de áreas degradadas pela mineração de bauxita. **Revista Cerne**, Lavras, v.11, n.2, p.187-196, 2005.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.

LIMA, J. D. et al. Efeitos da luminosidade no crescimento de mudas de *Caesalpinia férrea* Mart. ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Acta Amazonica**. Manaus, v.38, p.5-10, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol. 3, 1ª Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 384, 2009.

MAGALHÃES, N. S, MARENCO, R. A, MENDES, K. R. Aclimação de mudas de acariquara à alta irradiância. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.44, n.7, p.687-694, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science 2**: p.176-177, 1962.

MARANA, J. P. et al. Índices de qualidade e crescimento de mudas de café produzidas em tubetes. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, p.39-45, 2008.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 2.ed.Viçosa, MG: Universidade Federal Viçosa, 2005. 451p.

MARTINS, C. C. et al. Posição da semente na semeadura e tipo de substrato sobre a emergência e crescimento de plântulas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v.22, n.4, p.845-852, 2012.

MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; SPIERING, S. H. Umedecimento do substrato na emergência e vigor de plântulas de pupunheira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.31, n.1, p.224-230, 2009.

MEDEIROS, L. A. M. Crescimento e desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) conduzida em estufa plástica com fertirrigação em substratos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.31, n.2, p.199-204, 2001.

MESQUITA, E. F. de. et al. Produção de mudas de mamoeiro em função de substratos contendo esterco bovino e volumes de recipientes. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v.7, n.1, p.58-65, 2012.

MIELKE, M. S.; SCHAFFER, B. Photosynthetic and growth responses of *Eugenia uniflora* L. seedlings to soil flooding and light intensity. **Environmental and Experimental Botany**. Amsterdam, v.68, p.113–121, 2010.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B.; SILVA JUNIOR, J. F. Efeito do substrato na emergência, crescimento e comportamento estomático em plântulas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.25, n.1, p.15- 18, 2003.

PACHECO, P.; PAULILO, M. T. S. Efeito da intensidade de luz no crescimento inicial de plantas de *Cecropia glazioui* Snethlage (Cecropiaceae). **Insula: Revista de Botânica**. Florianópolis, v.38, n.1, p.28-41, 2009.

PAIVA, L. C.; GUIMARÃES, R. J.; SOUZA, C. A. S. Influência de diferentes níveis de sombreamento sobre o crescimento de mudas de café ( *Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.27, n.1, p.134-140, 2003.

PEREIRA, C. et al. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> + cosolvent. **Journal of medicinal food**. New York, v.8, p.533 – 538, 2005.

PEREIRA, P. S et al.; Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity; **Química Nova**, v. 31, p. 20 - 24, 2008.

PESKE, S. T.; LUCA FILHO, O. A.; BARROS, A. C. S. A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**.2.ed. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2006. p.470.

PIANA, M. et al. Phytochemical analysis and antioxidante capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Fruits and branches. **Anais Acadêmia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v.86, n.2, p.881-888, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 728p.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. **Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*)**. Colombo: Embrapa, 2008. (Comunicado Técnico, 128).

REIS, E. R. et al. Período de permanência de mudas de *Eucalyptus grandis* em viveiro baseado em parâmetros morfológicos. **Revista Árvore**. Viçosa, v.32, n.5, p.809-814, 2008.

REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; MAESTRI, M. Crescimento de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis* e *E. cloeziana* sob diferentes níveis de restrição radicular. **Revista Árvore**. Viçosa, v.13, n.1, p.1-18, 1989.

SAIDELLES, F. L. F. et al. Casca de arroz carbonizada como substrato para produção de mudas de tamboril-da-mata e garapeira. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.30, n.1, p.1173-1186, 2009.

SALTON, J. C. et al. Agregação e estabilidade de agregados do solo em sistemas agropecuários em Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v.32, p.11-21, 2008.

SCALON, S. P. Q. et al. Crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns sob condição de sombreamento. **Revista Árvore**. Viçosa, v.27, n.6, 753-758, 2003.

SCALON, S.P.Q. et al. Germinação e crescimento inicial da muda de orelha-de-macaco (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong): efeito de tratamentos químicos e luminosidade. **Revista Árvore**. Viçosa, v.30, n.4, p.529-536, 2006.

SOARES, F. C. et al. Consumo de água pela cultura do lírio, cultivado em substratos alternativos em condições de ambiente protegido. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.42, n.6, p.1001-1006, 2012.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande Do Sul, Brasil**. São Carlos, SP, p. 350, 2006.

STREIT, M. N. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

STURION, J. A.; ANTUNES, J. B. M. Produção de mudas de espécies florestais. In: GALVÃO, A. P. M. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**. Brasília: Embrapa, 2000. p.125-150.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se que em *Tabernaemontana catharinensis* temperaturas mais altas (25 e 30 °C) favorecem a germinação das sementes, independente do regime de luz, comportando-se como fotoblásticas neutras. Durante o armazenamento das sementes por 180 dias ocorreu a perda de água das mesmas para o ambiente nas três condições de armazenamento (câmara de crescimento a 25 °C, refrigerador a 10 °C e câmara fria a 4 °C), porém não ocorreu redução nas percentagens de germinação, demonstrando um comportamento ortodoxo para as sementes de *T. catharinensis*.

A pré-imersão das sementes em ácido giberélico não promoveu maiores percentagens de germinação *in vitro* das plântulas, independente da concentração utilizada (0,0; 300 e 600 mg L<sup>-1</sup>) e do tempo de imersão (24 e 48h). As concentrações de 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> por 48h de pré-imersão reduziu a velocidade de germinação das sementes *T. catharinensis*. Segmentos cotiledonares retirados das plântulas obtidas *in vitro* neste experimento não formaram plantas completas até os 70 dias após a inoculação dos mesmos. Houve formação de brotações adventícias quando cultivados em meio acrescido de BAP e ANA, sendo as percentagens superiores a 89%. Combinações de BAP e ANA (6,0 x 0,6 e 4,0 x 0,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) proporcionaram aumento no comprimento das brotações. Houve uma tendência a promover maior número de brotos na concentração intermediária de BAP e ANA (2,0 x 0,2 mg L<sup>-1</sup>) por explante cotiledonar, evidenciando ser mais eficiente para a micropropagação, por fornecer maior quantidade de novos explantes.

Microestacas de 4,0 cm de comprimento retiradas de plântulas cultivadas *in vitro* por 90 dias enraizaram sem a necessidade de AIB no meio de cultura, porém as maiores percentagens, 96,5 e 89,5%, ocorreram nas concentrações de 1,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, respectivamente, não diferindo entre si. A suplementação com 6,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB ao meio de cultura aumentou significativamente o número de pontas de raiz (8,63), parâmetro essencial para posterior processo de aclimatização, por aumentar a região de absorção de água e nutrientes e a translocação solo - planta.

A adição de vermiculita ou casca de arroz carbonizada (CAC) conjuntamente com substrato comercial Mecplant<sup>®</sup> proporcionou maior percentagem de emergência das plântulas, quando comparado com o uso isolado de Mecplant<sup>®</sup>. Porém a adição

de vermiculita demonstrou ser mais adequado, tendo em vista que além de promover maiores percentagens de emergência propiciou também maior velocidade de emergência e valores para parâmetros de crescimento (altura e área foliar aos 90 e 180 DAS e diâmetro do colo aos 180DAS) nas formulações com 25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V (T4) e 50% Mecplant<sup>®</sup> + 50% V (T3). Estes tratamentos, promoveram um incremento em relação à produção de biomassa tanto da parte aérea como da raiz e conseqüentemente a massa seca total, demonstrando valores superiores para o índice de qualidade de Dickson (IQD), 0,879 para (T4) e 0,863 para (T3). Ficou evidenciado que os substratos não influenciaram a quantidade de pigmentos fotossintéticos (chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub>, chl total e carotenoides), havendo diferença significativa apenas para a variável relação chl<sub>a</sub>/b nos tratamentos T2 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% V), T4 (25% Mecplant<sup>®</sup> + 75% V) e T5 (75% Mecplant<sup>®</sup> + 25% CAC).

Os resultados do potencial germinativo das sementes e da emergência de plântulas de *Tabernaemontana catharinensis*, bem como dos parâmetros morfofisiológicos de plântulas e plantas obtidas *in vitro* e *ex vitro* foram relevantes, tendo em vista a importância de estudos que agreguem mais conhecimento das espécies nativas com potencial medicinal na busca pela preservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTREL, P. P. (2012). **Micropropagação, teor e composição química volátil de *Hyptis marrubioides* Ep. e atividade inseticida.** Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia). Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras – UFLA. 119p.

CALDAS, I. S.; HARIDASON, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.2, p.87-132.

CARVALHO FILHO J. L. S. et al. Produção de mudas de *Cassia grandis* L. em diferentes ambientes, recipientes e misturas de substratos. **Revista Ceres.** Viçosa, v.40, n.284, p.341-352, 2002.

CHI, Y. M. et al. Pharmacological study on the novel antinociceptive agent, a novel monoterpene alkaloid from *Incarvillea sinensis*. **Biological Pharmaceutical Bulletin.** Japan, v. 28, p.1989-1991, 2005.

FERREIRA, J. T. B., CORRÊA, A. G. & VIEIRA, P.C. **Produtos Naturais no Controle de Insetos.** São Carlos: Editora da UFScar, p.176, 2001.

FONSECA, M. G.; LEÃO, N. V. M.; SANTOS, F. A. M. Germinação e crescimento inicial de plântulas de *Pseudopiptadenia psilostachya* (DC.) G.P. Lewis & M.P. Lima (Leguminosae) em diferentes ambientes de luz. **Revista Árvore.** Viçosa, v.30, n.6, p.885-891, 2006.

GUEDES R. S. et al. Substratos e temperaturas para testes de germinação e vigor de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. **Revista Árvore.** Viçosa, v.34, p.57-64, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCPT/Embrapa CNPq, 1990, p. 99-169.

KHAWAR, K. M. et al. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. **Turk Journal Botany.** Turk, v.28, p.421-6, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Vol. 3, 1ª Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 384, 2009.

MATOS, T. M. F., **Manejo agroecológico de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.),** 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2011.

MORANDI, M. A. B. Integração de métodos físicos e biológicos no controle de doenças em viveiros de plantas medicinais: estudo de caso com *Cordia verbenácea*. In: BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas** (editores). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 336-341.

RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. Israel, v.20, n.2 p.101-153, 2002.

PEREIRA, C. et al. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> + cosolvent. **Journal of medicinal food**. New York, v.8, p.533 – 538, 2005.

PEREIRA, P. S et al. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. **Química Nova**. São Paulo, v.31, n.1, p.20-24, 2008.

PEREIRA, D. S; PEREIRA, M. S; BEZERRA, A. M. E. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Cochlospermum vitifolium* (Will.) Sprengel. **Floresta e Ambiente**. Seropédica, v.20, n.3, p.391-397, 2013.

PIANA, M. et al. Phytochemical analysis and antioxidante capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Fruits and branches. **Anais Acadêmia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v.86, n.2, p.881-888, 2014.

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

QUINET, C. G. P.; ANDREATA, R. H. P. **Estudo Taxonômico e Morfológico das Espécies de Apocynaceae Adans na Reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil**. Pesquisa Botânica, v. 56, p. 13-74, 2005.

SCHUMACHER, M. V.; HOPPE, J. M.; FARIAS, J.A. **Manual de instruções para a coleta, beneficiamento, armazenamento e análise de sementes florestais**. Santa Maria: UFSM/AFUBRA, Projeto Bolsa de Sementes de Espécies Florestais, p. 28, 2002.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande Do Sul, Brasil**. São Carlos, SP, p.350, 2006.

TONIN, G. A.; PEREZ, S. C. J. G. A. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocotea porosa* (Nees et Martius ex. Nees) após diferentes condições de armazenamento e semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, v.28, n.2, p.26-33, 2006.

APÊNDICE A – MATRIZES FORNECEDORAS DE FRUTOS (A), FRUTOS MADUROS (B), SEMENTES APÓS O BENEFICIAMENTO (C) E SEMENTES GERMINADAS COM PROTRUSÃO 0,3 CM DE RADÍCULA AOS 15 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (D) DE *Tabernaemontana catharinensis*.



**APÊNDICE B – PLÂNTULAS *IN VITRO* COM 70 DIAS DE IDADE, DOADORAS DE SEGMENTOS COTILEDONARES (A), BROTAÇÕES AÉREAS EM SEGMENTOS COTILEDONARES APÓS 45 DIAS DE INOCULAÇÃO EM MEIO DE CULTIVO (B), MICROESTACAS COM 90 DIAS DE IDADE (C), MICROESTACAS INOCULADAS EM MEIO DE CULTIVO (D) E MICROESTACAS APÓS 30 DIAS DE INOCULAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE AIB (E) DE *Tabernaemontana catharinensis*.**



**APÊNDICE C – PLÂNTULAS AOS 90 DIAS APÓS A SEMEADURA (DAS) EM CASA DE VEGETAÇÃO (A) E AOS 180 (DAS) (B) DE *Tabernaemontana catharinensis*.**



**B**