



**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA  
(*Strelitzia reginae* Ait.) E CONTROLE DE  
OXIDAÇÃO COM IDENTIFICAÇÃO DOS  
COMPOSTOS LIBERADOS NO MEIO DE  
CULTURA**

**PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA**

**1998**

Associação do Lar

43978

MEN30674

PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA (*Strelitzia reginae*  
Ait.) E CONTROLE DE OXIDAÇÃO COM IDENTIFICAÇÃO DOS  
COMPOSTOS LIBERADOS NO MEIO DE CULTURA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. MOACIR PASQUAL

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1998



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

Paiva, Patrícia Duarte de Oliveira.

Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.), controle de oxidação com identificação de compostos liberados no meio de cultura / Patrícia Duarte de Oliveira Paiva. – Lavras : UFLA, 1998.

84 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Estrelícia. 2. Cultura de tecidos. 3. Cultura de embriões. 4. Oxidação. 5. Cromatografia. 6. Fenóis. I. Universidade Federal de Lavras.  
II. Título.

CDD-581.0724

-631.53

PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA (*Strelitzia reginae*  
Ait.) E CONTROLE DE OXIDAÇÃO COM IDENTIFICAÇÃO DOS  
COMPOSTOS LIBERADOS NO MEIO DE CULTURA**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do Curso  
de Doutorado em Agronomia, área de  
concentração Fitotecnia, para obtenção do título  
de "Doutor".

APROVADA em 25 de setembro de 1998

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso  
(co-orientadora)

UFLA

Prof. Dr. Ricardo Motta Miranda

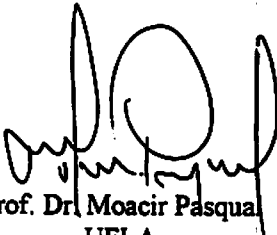
UFRRJ

Profa. Dra. Linda Styer Caldas

UnB

Prof. Dr. José Darlan Ramos

UFLA



Prof. Dr. Moacir Pasqua  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS - MINAS GERAIS  
BRASIL

*Aos meus pais, Benedito e Maria José*

*Aos meus irmãos Ana Paula, Jorge e Daniela*

*A meu esposo Renato*

*A minha sogra D. Clymar*

*Pelo carinho, apoio, incentivo*

**DEDICO**

*Ao Vantuil,*

*Pelo seu espírito cientista,*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Às Instituições UFLA – Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura e CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), agradeço pela oportunidade de realizar este curso.

Ao orientador Prof. Moacir Pasqual,

Aos co-orientadores Profa. Maria das Graças Cardoso e Prof. Eduardo Bearzoti,

Ao Prof. David Lee Nelson,

Aos membros da banca Profa. Linda Styer Caldas, Prof. Ricardo Motta Miranda e Prof. José Darlan Ramos,

Aos laboratoristas Vantuil Antônio Rodrigues e Antônio Clarete de Oliveira,

Aos amigos Juliana, Mariana, Anna Lygia, Adriano, Mônica, Vera Lúcia, Fábio, Helen, Dulcimara, Luciana, Kátia, Neuza, Vicentina,

*Pelo carinho, amizade, auxílio e sugestões oferecidas na realização deste trabalho.*

## AGRADEÇO

## BIOGRAFIA

**PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA**, filha de Benedito Lemos de Oliveira e Maria José Duarte Lemos, nasceu em 14 de janeiro de 1969, em Itanhandu, sul de Minas Gerais. Depois de residir em outras cidades de Minas de Gerais, mudou-se para Lavras em 1975 quando seu pai assumiu a cadeira de professor na então Escola Superior de Agricultura de Lavras. Realizou o curso primário na Escola Estadual Firmino Costa entre 1976 e 1979. Entre 1980 e 1986 fez o curso ginásial e científico no Instituto Gammon. Em 1987 iniciou o curso de graduação em Agronomia na Escola Superior de Agricultura de Lavras, concluindo-o em abril de 1992, quando em seguida iniciou o curso de Mestrado em Agronomia-Fitotecnia nesta mesma instituição. Defendeu a dissertação intitulada "Propagação *in vitro* de crisântemo" em setembro de 1994. Em 1995, iniciou o curso de doutoramento em Agronomia-Fitotecnia na Universidade Federal de Lavras. Atualmente é professora de Floricultura e Paisagismo na Universidade Federal de Lavras.



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iv</b>
<b>CAPÍTULO I INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>2</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Estrelícia .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Micropropagação .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Oxidação .....</b>	<b>5</b>
<b>2.4 Determinação de substâncias orgânicas.....</b>	<b>6</b>
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>8</b>
<b>CAPÍTULO II ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE ESTRELÍCIA (<i>Strelitzia reginae</i> Ait.) E CONTROLE DE OXIDAÇÃO NO MEIO DE CULTURA.....</b>	<b>11</b>
<b>1 RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>4 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1 Desenvolvimento <i>in vitro</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2 Oxidação .....</b>	<b>16</b>
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE ESTRELÍCIA UTILIZANDO GEMAS AXILARES E SEGMENTOS FOLIARES.....</b>	<b>20</b>
<b>5.1.1 Indução de morfogênese ou calogênese em segmentos foliares .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1.2 Indução de morfogênese em gemas axilares .....</b>	<b>22</b>
<b>5.2 ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE ESTRELÍCIA UTILIZANDO EMBRIÕES IMATUROS.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2.1 Avaliação do efeito de idade para coleta dos embriões, sacarose e concentrações do meio MS .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2.2 Avaliação do efeito de BAP sobre o desenvolvimento dos embriões .....</b>	<b>25</b>

5.2.3 Efeito da água de coco, de sulfato de adenina e do meio Knudson no desenvolvimento dos embriões.....	25
5.3 <i>CONTROLE DE OXIDAÇÃO</i> .....	26
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
6.1 <i>ESTABELECIMENTO IN VITRO DE ESTRELÍCIA UTILIZANDO GEMAS AXILARES E SEGMENTOS FOLIARES</i> .....	29
6.2 <i>ESTABELECIMENTO IN VITRO DE ESTRELÍCIA UTILIZANDO EMBRIÕES IMATUROS</i> .....	30
6.2.1 Efeito de concentrações do meio MS e idades dos embriões .....	32
6.2.2 Efeito de concentrações de sacarose e idades dos embriões.....	37
6.2.3 Efeito do regulador de crescimento BAP sobre o desenvolvimento dos embriões .....	45
6.3 <i>CONTROLE DE OXIDAÇÃO</i> .....	47
6.4 <i>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</i> .....	58
7 CONCLUSÕES .....	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
<b>CAPÍTULO III. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS COMPONENTES DOS EXUDATOS PRESENTES NO MEIO DE CULTURA DEVIDO AO PROCESSO DE OXIDAÇÃO</b> .....	<b>68</b>
1 RESUMO.....	68
2 ABSTRACT .....	68
3 INTRODUÇÃO .....	69
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	70
5 METODOLOGIA.....	72
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	75
7 CONCLUSÕES .....	81
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**2,4-D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**AIB:** Ácido Indol Butírico

**ANA:** Ácido Naftaleno Acético

**B5:** Meio de Gamborg (1968)

**BAP (= BA):** 6-Benzilaminopurina = 6-Benziladenina

**CA:** Carvão Ativado

**CCD:** Cromatografia de Camada Delgada

**CL:** Cromatografia Líquida

**CLC:** Cromatografia Líquida em Coluna

**MS:** Meio básico de Murashige e Skoog (1962).

**PVP:** Polivinilpirrolidone. PVP 10: peso molecular = 10.000

**Phytigel:** Produto comercial constituído de polímeros de bactérias capaz de solidificar meio de cultura.

## RESUMO

PAIVA, Patrícia Duarte de Oliveira. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação de compostos liberados no meio de cultura. Lavras, UFLA, 1998. 86p. (Tese - Doutorado em Agronomia) \*

A estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) é uma planta ornamental de grande valor comercial. O seu desenvolvimento, no entanto, é bastante lento e, conseqüentemente, a produção de novas mudas também é demorada, além de apresentar dormência nas sementes. Através da cultura de tecidos é possível reproduzir plantas com eficiência, evitando os problemas normalmente encontrados nos métodos tradicionais de propagação. O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras objetivando micropropagar estrelícia. Para o estabelecimento *in vitro*, utilizaram-se como explantes gemas axilares, segmentos foliares e embriões imaturos. Avaliou-se o efeito dos meios de cultura MS, B5, Ziv e Halevy, acrescidos de antioxidantes como PVP e carvão ativado, além de benomyl e bactericidas (oxitetraciclina e cloranfenicol), sob o desenvolvimento das gemas axilares e segmentos foliares, em condições de luz e escuro. Não se obteve regeneração destes explantes nestas condições. No cultivo dos embriões avaliaram-se datas para coleta das sementes em combinação com diferentes concentrações de sacarose e do meio de cultura e níveis de BAP. Avaliou-se ainda o efeito da adição ao meio de cultura das substâncias carvão ativado, PVP, cisteína, ácido ascórbico e ácido cítrico em diferentes níveis com o objetivo de controlar o processo oxidativo. Com este mesmo objetivo utilizou-se também diferentes substâncias para solidificação do meio, como agarose, ágar e phytigel. A exclusão do meio de cultura dos nutrientes cobre e ferro também foi testada. Determinou-se como melhor data para coleta das sementes e extração dos embriões, 20 semanas após a polinização. As diferentes concentrações do meio MS não alteraram o desenvolvimento dos embriões, o qual foi influenciado pelas diferentes concentrações de sacarose, ocorrendo melhor desenvolvimento na presença de 20,64 g/L. A adição de BAP, à medida em que se elevaram as dosagens testadas, proporcionou a formação de plantas com tamanhos menores. Os melhores resultados de controle de oxidação foram obtidos para os embriões cultivados em meios com concentrações mais elevadas de carvão ativado ou solidificados

com phytigel. Realizou-se ainda a identificação dos compostos liberados no meio de cultura, através de técnicas de cromatografia e infravermelho, o que permitiu identificar nos extratos a presença de compostos fenólicos ou seus derivados.

---

Comitê de Orientação: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador); Maria das Graças Cardoso – UFLA (Co-orientadora), Eduardo Bearzoti – UFLA (Co-orientador).

## ABSTRACT

PAIVA, Patricia Duarte de Oliveira. *In vitro* establishment of strelitzia (*Strelitzia reginae* Ait.) and control of the oxidative process with identification of compounds released in the culture medium. Lavras, UFLA, 1998. 86p. \*

*Strelitzia* (*Strelitzia reginae* Ait.) is an ornamental plant of high commercial value. Its development is slow and the seed presents dormancy which turns it difficult the production of seedlings. Through the use of tissue culture, it is possible to propagate plants that normally show difficulties to reproduce by seeds. The present work have been developed at the Federal University of Lavras and the objective was to *in vitro* propagate strelitzia. For the *in vitro* establishment, axillary buds, leaf segments and immature embryos were used as explants. The effect of the culture media MS, B5 and Ziv & Halevy supplemented with PVP, activated charcoal, benomyl, oxytetracyclin and chlorphenicol was evaluated on the development of axillary buds and leaf segments in the presence or absence of light. No germination was observed in these conditions. For embryo culture, different seed harvest dates in combination with different concentrations of sucrose, culture medium and BAP were evaluated. To control the oxidative process the effect of the addition to the culture media of activated charcoal, PVP, cysteine, ascorbic acid, citric acid, agarose, agar and phytigel in different levels was also evaluated. The lack of copper and iron on the culture media was also tested. The best date of harvesting seeds for embryo extraction is 20 weeks after pollination. No embryo development was observed varying the concentration of MS medium. However, better embryo development was observed in the presence of 20,64 g/L sucrose. Increasing BAP levels induced the formation of smaller plants. Best control of oxidation was obtained for embryos cultivated in media presenting elevated concentrations of activated charcoal or solidified with phytigel. Chromatography and infrared techniques provide the identification of phenolic compounds and their derivatives released *in vitro* by embryo explants.

Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Advisor); Maria das Graças Cardoso – UFLA (Co-adviser); Eduardo Bearzoti – UFLA (Co-adviser).

**CAPÍTULO I**

**INTRODUÇÃO**

## CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A estrelicia (*Strelitzia reginae* Ait.) (Figura 1) é uma planta ornamental de expressivo valor comercial e sua produção desperta especial interesse no mercado externo. Esta planta, no entanto, é de lento desenvolvimento, demandando de 5 a 7 anos para iniciar a produção de flores. A propagação é feita através de divisão de touceiras, resultando em pequeno número de mudas ou por sementes, as quais apresentam dormência.



FIGURA 1. Aspecto visual da inflorescência de *Strelitzia reginae* Ait. UFLA, Lavras/MG, 1997.

A cultura de tecidos é uma técnica alternativa de propagação de plantas, pois permite que esta seja feita de forma rápida e em larga escala. A micropropagação de plantas ornamentais representa um grande impacto tanto científica como economicamente, principalmente devido ao valor (financeiro, sanitário e de qualidade) do produto final em comparação com outras técnicas (Queralt et al., 1991).



Os primeiros testes para micropropagação de estrelicia foram realizados por Ziv e Halevy em 1983, quando conseguiram obter plantas utilizando gemas axilares como explantes. Este método, no entanto, é destrutivo, havendo a necessidade de extração e destruição das mudas, as quais produzem individualmente entre 5 a 10 gemas. Por outro lado, este método é importante pois permite que as plantas produzidas *in vitro* sejam clonadas utilizando-se segmentos foliares e embriões imaturos como fonte de explante. Para a obtenção dos embriões, a polinização manual se faz necessária, pois a autopolinização e polinização cruzada, realizadas por insetos, geram pequeno número de frutos. A floração destas plantas é concentrada no inverno, o que leva à produção sazonal de frutos na primavera.

Em algumas plantas a liberação de exudatos constitui um dos maiores problemas para o cultivo *in vitro* (Queralt et al., 1991). Em avaliações preliminares observou-se a ocorrência de processo oxidativo no meio de cultura, com a característica deste se desenvolver em diferentes colorações, o que gerou a necessidade de se aprofundar os estudos neste fenômeno, procurando correlacioná-lo com alguma característica experimental ou inerente à planta, além de se proceder à identificação dos compostos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Estrelícia

A estrelícia, comumente conhecida como ave-do-paráiso, pertence à família Strelitziaceae, ordem Zingiberales, originária da África, mas atualmente encontra-se largamente difundida nos países de clima tropical (Lopes e Menezes, 1980). Atualmente as espécies identificadas são *Strelitzia reginae* e *S. parvifolia*, as quais diferem entre si pela anatomia das folhas: a *parvifolia* não apresenta limbo. Estas plantas destacam-se pelo aspecto bastante exótico de suas flores, que são constituídas de inflorescências de coloração alaranjada (mais comum), amarela ou branca e estigma labelado azul (Watson e Dallwitz, 1996).

Por ser planta de origem tropical é perfeitamente adaptada ao Brasil, podendo ser encontrada nas mais diferentes regiões. Atualmente é utilizada em paisagismo para a composição de jardins e em produções comerciais como flor cortada. Pelas belas características das suas flores e por ser uma planta de origem tropical, a estrelícia apresenta grande potencial de comercialização no mercado externo, além da sua valorização no mercado nacional.

A estrelícia apresenta lento desenvolvimento, podendo as plantas obtidas de sementes levarem de 5 a 7 anos para florescer. As sementes apresentam impermeabilidade de tegumento, assim, em condições naturais, a germinação ocorre somente após 18 semanas (Lopes e Menezes, 1980; Ziv e Halevy, 1983). Para a propagação assexuada, através da divisão de touceiras, as plantas matrizes devem possuir pelo menos 10 anos de idade e a produção de mudas é em número reduzido (Ziv e Halevy, 1983). Pelas dificuldades determinadas em função do tempo necessário para floração, ainda não existe um programa de seleção de cultivares definido e, aliado ao grande potencial de crescimento da comercialização desta flor no mercado externo, a cultura de tecidos apresenta-se como uma importante técnica para propagação desta espécie, pois além de ser possível diminuir o tempo para a produção de novas mudas, permite também sua produção em larga escala.

## 2.2 Micropropagação

Um dos únicos trabalhos registrados na literatura sobre a micropropagação de estrelicia foi realizado por Ziv e Halevy em 1983, na Universidade de Jerusalém (Israel). Neste trabalho, os autores utilizaram como fonte de explante gemas axilares e terminais, método destrutivo e que exige um número elevado de matrizes para obtenção dos explantes.

A utilização de embriões e folhas jovens evita a destruição de matrizes e pode ser bastante eficiente para a micropropagação de plantas (Pierik, 1987). O cultivo de embriões pode ser utilizado com o objetivo de superar a dormência das sementes, produção de novas plantas em curto espaço de tempo e auxiliar nos programas de hibridação interespecífica (Pasqual e Pinto, 1989).

De modo geral, os embriões são coletados em estágio imaturo e inoculados *in vitro* na presença de sacarose, um componente essencial para seu desenvolvimento, pois oferece suprimento energético e aumenta a pressão osmótica do meio de cultura (Pierik, 1987; George, 1996a). A exigência em sacarose é, porém, variada em função do estágio de maturação, sendo que embriões imaturos são mais exigentes (Hu e Ferreira, 1990).

## 2.3 Oxidação

Um problema identificado por Ziv e Halevy (1983) foi a ocorrência de oxidação no meio de cultura. Em cultura de tecidos o termo oxidação corresponde à mudança de coloração do meio devido à liberação de compostos fenólicos pelo explante (Gould e Murashige, 1985).

A ocorrência de oxidação pode ser geneticamente correlacionada, pois alguns gêneros apresentam maior susceptibilidade a este processo. Segundo Cai e Butler (1990), plantas com maiores teores de taninos ou hidroxifenóis como *Quercus*, *Rhododendron*, *Sorghum* e coníferas possuem maior tendência a apresentarem oxidação *in vitro*. A variação de intensidade de oxidação, no

entanto, pode ser inerente a diferentes espécies ou variedades. Em sorgo, por exemplo, diferentes cultivares apresentam variações de tolerância à oxidação e na coloração dos pigmentos liberados (Cai e Butler, 1990).

Para prevenir a ocorrência de oxidação, George (1996b) recomenda minimizar os danos causados ao explante através da remoção de compostos fenólicos produzidos e alterações na composição do meio de cultura, especialmente na concentração ou no tipo de reguladores de crescimento utilizados. A remoção dos compostos pode ser feita pela utilização de meios líquidos, de diferentes agentes de solidificação ou substâncias de adsorção.

Para o controle da oxidação, diversos produtos podem ser utilizados, adicionados ao meio de cultura, como a cisteína, carvão ativado, PVP, ácido ascórbico ou ácido cítrico. O carvão ativado age adsorvendo os exudatos liberados pelos explantes, os quais causam a oxidação. O PVP reage com estas substâncias enquanto que a cisteína e os ácidos ascórbico e cítrico reagem com metais presentes no meio de cultura evitando que estes estejam disponíveis para oxidar (Jarret, Rodrigues e Fernandez, 1985; George 1996b).

Outras modificações na composição dos meios de cultura também podem ser eficientes para controle da oxidação como variações na concentração do meio MS, exclusão ou diminuição de elementos redutores como ferro e cobre e variações em tipo e níveis de reguladores de crescimento (Jarret, Rodrigues e Fernandez, 1985).

#### **2.4 Determinação de substâncias orgânicas**

Para identificar a composição de substâncias, podem-se utilizar técnicas cromatográficas, as quais permitem separar os compostos químicos constituintes de uma substância (Harborne, 1984). Técnicas como Infravermelho, Ultravioleta, Ressonância Magnética Nuclear de Prótons são usadas para a determinação dos grupos funcionais de uma substância (Silverstein, Bassler e Morrill, 1994; Ferri, 1996).

A Cromatografia Líquida (CL) permite a separação de íons metálicos e compostos orgânicos. O emprego desta cromatografia em colunas contendo um adsorvente (sílica) tem sido utilizado para separação de diversas substâncias extraídas de substratos variados (Silverstein, Bassler e Morril, 1994).

A Cromatografia de Camada Delgada (CCD) é utilizada para separar compostos orgânicos. Pela CCD, a separação dos compostos é feita por migração diferencial, em função da polaridade (soluto x solvente). As frações separadas são coletadas para realização de outras análises (Ewing, 1972; Jeffery, 1989).

O processo de separação depende do solvente utilizado na fase móvel, podendo ser por adsorção, partição, troca iônica e/ou filtração de gel. A CCD é mais rápida e geralmente mais aplicável que as outras técnicas cromatográficas líquidas, sendo assim largamente utilizada, principalmente para análises qualitativas (Ewing, 1972; Jeffery, 1989).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAI, T.; BUTLER, L. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.20, p.101-110, 1990.
- EWING, G.W. **Métodos instrumentais de análise química**, v.2. São Paulo: Editora Edgard Blucher (USP), 1972. 514p. (trad.).
- FERRI, P.H. Química de produtos naturais - métodos gerais. In: DI STASSI, L.C. (ed.) **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo:UNESP, 1996, p.129-156.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 - The Technology, 2 ed. Edington: Exegetics Limited, 1996a, 1574 p.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, part 2 - In Practice, 2 ed. Edington: Exegetics Limited, 1996b, 1361p.
- GOULD, J.H.; MURASHIGE, T. Morphogenic substances released by plant tissue cultures. I. Identification of berberine in *Nandina* culture medium, morphogenesis and factors influencing accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.4, n.1, p.29-42, 1985.
- HARBORNE, J.B. Methods of plant analysis. In: HARBORNE, F.B. (ed.) **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. Hong Kong: Chapman and Hall, 1984. p. 1-36.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, EMBRAPA/CNPq-ABCTP, 1990. p.71-86.
- JARRET, R.L.; RODRIGUEZ, W.; FERNANDEZ, R. Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' plantains in Costa Rica. *Scientia Horticulturae*, v.25, p.137-147, 1985.
- JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNY, R.C. **Análise química quantitativa**, 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1989. 712p. (Trad.).
- LOPES, L.C.; MENEZES, I.T. **O cultivo da strelitzia**. Viçosa, UFV, 1980. 10p. Boletim de Extensão n. 23.
- PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. **Cultura de embriões**. Brasília: ABCTPNotícias, p.2-12, 1989.

- PIERIK, R. L. M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Martinus Nyjhoff Publishers, 1987. 344p.
- QUERALT, M.C.; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; DEBERGH, P.C. Ornamentals. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds.). *Micropropagation – Technology and Application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991. p.215-229.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 5 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1994, 387p. (Trad.).
- ZIV, M.; HALEVY, A.H. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. *HortScience*, v.18, n.4, p.434-436, 1983.
- WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version November 25, 1996. URL <http://www.keil.ukans.edu/delta/>.

## **CAPÍTULO II**

### **ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA (*Strelitzia reginae* Ait.) E CONTROLE DE OXIDAÇÃO NO MEIO DE CULTURA**



## **CAPÍTULO II. ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA (*Strelitzia reginae* Ait.) E CONTROLE DE OXIDAÇÃO NO MEIO DE CULTURA**

### **1 RESUMO**

A estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.), devido ao seu lento desenvolvimento em condições naturais e pela sua importância como planta ornamental, requer uma metodologia especial para tornar eficiente seu processo de propagação. Pela cultura de tecidos é possível reproduzir plantas com eficiência e em larga escala. Para efetuar o estabelecimento *in vitro* de estrelícia utilizaram-se como fonte de explante segmentos foliares, gemas axilares e embriões imaturos. Avaliou-se o efeito de diferentes meios de cultura (MS, B5, Knudson, Ziv e Halevy), de diferentes níveis de sacarose e de BAP, de substâncias como carvão ativado, PVP, ácido cítrico, ácido ascórbico e cisteína com o objetivo de controlar a oxidação de diferentes tipos de solidificantes e exclusão dos elementos ferro e cobre do meio de cultura. Não foi possível regenerar plantas utilizando gemas axilares e segmentos foliares. Plantas foram obtidas apenas de embriões coletados 20 semanas após a polinização via embriogênese zigótica. Determinou-se como melhor concentração de sacarose 20,64 g/L. Diferentes concentrações do meio MS testadas não alteraram o desenvolvimento dos explantes. O controle de oxidação foi mais eficiente na presença de carvão ativado ou em meios solidificados com phytigel.

## 2 ABSTRACT

Due to its slow development in natural conditions and its importance as an ornamental plant, an alternative method is required for the propagation of strelitzia (*Strelitzia reginae* Ait.). Through the use of tissue culture it is possible to propagate plants with efficiency. In order to establish strelitzia *in vitro*, leaf segments, axillary buds and immature embryos used as explants. The effect of different culture media MS, B5, Knudson, Ziv e Halevy), different levels of sucrose, BAP, use of antioxidants such as activated charcoal, PVP, citric acid, ascorbic acid and cysteine, use of different gel solidifying substances and lack of iron and copper in the culture medium was evaluated. There was no regeneration of plants when axillary buds and leaf explants were used as explants. Plants were obtained only from embryos collected 20 weeks after pollination. The best sucrose concentration was 20,64 g/L. There was no influence of different concentrations of MS medium on explant development. Oxidation control was more efficient in the presence of activated charcoal or medium solidified with phytigel.

### 3 INTRODUÇÃO

A micropropagação de plantas vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de mudas sadias em grande número de espécies economicamente importantes ou com dificuldades de propagação. Neste contexto, as plantas ornamentais são de especial interesse para a propagação através de cultura de tecidos, não só em função do retorno econômico que representam, mas pela possibilidade de solucionar problemas como dificuldades de propagação, transporte e intercâmbio de mudas. A estrelicia é uma planta ornamental de lento desenvolvimento, necessitando de 5 a 7 anos para iniciar a produção de mudas. Além disto já se identificou presença de dormência e lenta germinação das sementes.

Assim sendo, a propagação desta espécie através de cultura de tecidos torna-se uma importante alternativa para produção comercial de mudas.

O objetivo deste trabalho foi promover o estabelecimento *in vitro* de estrelicia, a partir de diferentes explantes, estudando componentes do meio de cultura a fim de proporcionar o melhor desenvolvimento *in vitro* e o efeito da adição de diferentes substâncias ao meio para controlar ou minimizar a oxidação.

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 Desenvolvimento *in vitro*

A propagação de plantas através de gemas axilares e terminais é considerada destrutiva pois pode exigir a coleta de matrizes para obtenção dos explantes, o que dificulta o trabalho, especialmente quando a disponibilidade de material é limitante.

A utilização de embriões e folhas jovens evita a destruição de matrizes e pode ser bastante eficiente para a micropropagação de plantas (Pierik, 1987). O primeiro trabalho com cultura de embriões foi realizado em 1904 por Hanning (Hu e Wang, 1986). Segundo Pasqual e Pinto (1989) e Litz (1993), o cultivo de embriões normalmente é utilizado com o objetivo de superar a dormência das sementes, produção de novas plantas em curto espaço de tempo e para estudos em programas de hibridação interespecífica.

De modo geral, os embriões são coletados em estágio imaturo e, para seu desenvolvimento, a sacarose é um dos componentes essenciais do meio de cultura para fornecimento de energia a estes explantes, além de aumentar a pressão osmótica do meio de cultura (Collins e Grosser, 1984; Hu e Wang, 1986; Pierik, 1987; George, 1996a). A exigência em sacarose é variável em função do estágio de maturação dos embriões (Hu e Ferreira, 1990), que, se imaturos, exigem maiores concentrações (Saravitz e Raper, 1995). Pierik (1990) sugere que embriões maduros sejam cultivados em meios contendo 2-3% de sacarose e imaturos, com 8-12%. De acordo com Hu e Wang (1986), os embriões excisados maduros ou quase maduros são autotróficos, ou seja, são capazes de germinar em meio simples sem suprimento adicional de sacarose.

Uma das propriedades do meio de cultura é suprir os nutrientes necessários para o crescimento dos explantes. O meio Knudson foi desenvolvido em 1943 (George, 1996a) para propagação de sementes de orquídeas, meio este bastante similar aos primeiros meios desenvolvidos, os quais apresentavam

baixas concentrações de íons inorgânicos. Várias modificações foram realizadas nos primeiros meios de cultura até se chegar ao meio de Murashige e Skoog em 1962 (Murashige e Skoog, 1962). O meio desenvolvido por estes autores objetivava o cultivo de calos de tabaco, mas atualmente conhecido como MS, tem sido utilizado para desenvolvimento *in vitro* de diversas espécies e diferentes tipos de propagação (George, 1996a). A concentração dos nutrientes do meio MS é geralmente considerada elevada e, em função disto, muitas modificações têm sido estudadas com o objetivo de reduzir os níveis dos nutrientes, permitindo assim maior adaptação de cultivos *in vitro* (Pierik, 1987; Samartin, 1989). Por outro lado, segundo Krikorian (1991), a alta salinidade do MS é eficiente para cultivos que exigem concentrações mais elevadas de íons. O meio B5 foi desenvolvido por Gamborg e colaboradores em 1968 para o cultivo de suspensão de células de soja, sendo ainda utilizado principalmente para cultivo de células e micropropagação de monocotiledôneas. (George, 1996a).

O uso de água de coco para estimular o desenvolvimento de embriões foi descoberto por Overbeek et al. em 1941, trabalhando com *Datura*. A composição da água de coco muito se assemelha à composição do fluido encontrado próximo dos embriões de algumas espécies já estudadas, cuja função é estimular o desenvolvimento embrionário <sup>dos 2, 3 e 4</sup> destes (George, 1996a). Há indicações de que a água de coco, em concentrações baixas (5-10%), pode interagir com auxinas e promover o crescimento em situações que não ocorreria em sua ausência (Krikorian, 1991). Para a propagação rápida de alpinia (*Alpinia purpurata*), Chang e Criley (1993) utilizaram com sucesso 50% da concentração de sais do meio MS acrescido de 15% de água de coco e 2% de sacarose.

O crescimento e a morfogênese são controlados pela interação e balanço entre os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura e as substâncias de crescimento endógenas do explante. As citocininas são utilizadas em cultura de tecidos para estimular a divisão celular e atuam, consequentemente, no processo de morfogênese (George, 1996a). BAP é uma citocinina sintética muito utilizada devido a sua efetividade e baixo custo em relação às outras (Krikorian, 1991). Algumas referências, no entanto, indicam

que os embriões podem não requerer suprimento exógeno de reguladores de crescimento, mas este fator deve ser avaliado de acordo com a espécie (Collins e Grosser, 1984; Hu e Wang, 1986; George, 1996b).

A adenina pode estimular o crescimento de ápices meristemáticos, mas seu efeito é variável em função da espécie. O composto sulfato de adenina adicionado ao meio de cultura atua como fonte de nitrogênio e estimula a biossíntese de citocininas (George, 1996a). A presença de aminoácidos no meio de cultura também pode influenciar o desenvolvimento *in vitro*. Estudos realizados por Krikorian (1991) reportam que os aminoácidos sulfurados são necessários para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas e seu uso é especialmente recomendado para tecidos recalcitrantes.

#### 4.2 Oxidação

Um problema identificado por Ziv e Halevy (1983) foi a ocorrência de oxidação, processo definido por Gould e Murashige (1985) como sendo a mudança de coloração de compostos fenólicos liberados pelo explante no meio de cultura. Estes autores, pesquisando extratos do meio de cultura cultivados com *Nandina*, detectaram a presença de compostos fenólicos, aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas e alcalóides (especificamente berberina). Preece e Compton (1991) caracterizaram as substâncias encontradas em meio de cultura no cultivo de algumas espécies lenhosas e as identificaram como sendo taninos, flavonóides e fenóis. Ferimentos normalmente provocam oxidação, sendo que discos foliares apresentam maior oxidação do que segmentos nodais por sofrerem mais ferimentos (Preece e Compton, 1991). O efeito inibitório no desenvolvimento é atribuído à presença de taninos e fenóis, sendo a autotoxicidade dos exudatos variável com as cultivares, espécies e gêneros (Compton e Preece, 1988; Preece e Compton, 1991). Pesquisas indicam que compostos como a cisteína, o carvão ativado, PVP, ácido ascórbico e ácido cítrico têm sido adicionados ao meio de cultura com o objetivo de controlar o processo de oxidação. A maioria destes compostos age adsorvendo os exudatos

liberados pelos explantes os quais causam a oxidação. Gould e Murashige (1985) sugerem, para controle de oxidação, a lavagem do explante com antioxidantes como ácido cítrico e ácido ascórbico antes da inoculação e a adição de carvão ativado ao meio.

O carvão ativado tem sido adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,3 a 2,0% (Fridborg e Eriksson, 1965; Anagnostakis, 1974; Fridborg et al., 1978; Tisserat, 1979; Takayama e Misawa, 1980; Ziv e Halevy, 1983; Bon, Gendraud e Franclet, 1988; Guerra e Handro, 1988), com a finalidade de adsorver os fenóis presentes no meio de cultura, além de atuar induzindo os processos de morfogênese e rizogênese (Fridborg et al., 1978; George, 1996a). Bon, Gendraud e Franclet (1988), estudando sequóia, observaram que a adição de carvão ativado não foi eficiente para controlar a oxidação, mas estabilizou o processo, evitando que houvesse acúmulo de fenóis.

A poliamina PVP possui também a capacidade de adsorver os compostos fenólicos evitando que estes oxidem e polimerizem. Além de estimular a embriogênese, o PVP pode também reagir com fenóis oxidados e prevenir a ocorrência de oxidação por enzimas fenolases. Esta substância é geralmente adicionada ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,01-4,0 % (George, 1996b). A eficiência no uso de PVP e/ou carvão ativado, no entanto, varia de acordo com a espécie. Siqueira e Inoue (1991) observaram que a adição de PVP a 1,0 g/L não foi eficiente para o controle de oxidação em explantes de *Cocus* e Tisserat (1979) afirma que a utilização de carvão ativado tem sido mais eficiente do que PVP para controle de oxidação em explantes de palmeira.

Modificações na composição dos meios de cultura tais como variações na concentração do meio MS, exclusão ou diminuição em concentração de ferro e cobre; uso de reguladores de crescimento (variações em tipo e níveis); adição de antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico ou cisteína também podem ser eficientes para controle da oxidação (Jarret, Rodrigues e Fernandez, 1985).

O ácido cítrico atua como agente quelante de metais mas não é muito eficiente em retirar ferro da solução. Já o ácido ascórbico normalmente é

acrescido ao meio de cultura, possuindo a propriedade de estimular a atividade metabólica dos tecidos (George 1996a). Ainda segundo este autor, a efetividade destes ácidos só tem sido observada, quando adicionados ao meio em concentrações entre 10 e 140 mg/L, podendo reduzir a oxidação em 50%.

Nem todos os compostos produzidos pelo processo de oxidação são tóxicos, mas a maioria inibe o desenvolvimento dos explantes, podendo causar danos severos, principalmente no estágio inicial de desenvolvimento da cultura, levando até à morte (George e Sherrington, 1984). Compton e Preece (1988), por exemplo, adicionaram compostos fenólicos ao meio de cultura para calos de tabaco e estacas de morango e não observaram toxicidade dos exudatos aos explantes, o que se atribuiu às concentrações utilizadas, possivelmente baixas. Em alguns casos, os explantes podem apresentar oxidação apenas no início da cultura, a qual é diminuída à medida que ocorre desenvolvimento. A idade dos explantes também influencia na ocorrência de oxidação; de modo geral, explantes mais jovens são menos propícios à oxidação do que explantes mais velhos (George, 1996b).

A ocorrência de oxidação pode ser geneticamente correlacionada, ou seja, em gêneros cujas plantas apresentam maiores teores de tanino ou hidroxifenóis a oxidação ocorre de forma mais intensa como é o exemplo de *Quercus*, *Rhododendron*, *Sorghum* e das coníferas (George, 1996b). Estudos de Cai e Butler (1990), com diferentes cultivares de sorgo, observaram que estas apresentaram variações de tolerância à oxidação e na coloração dos pigmentos liberados, observando pigmentos com coloração vermelha, marron claro e marron avermelhado. Variações de intensidade na ocorrência dos pigmentos e na formação de necrose do explante também foram observadas. Estes pesquisadores sugerem que a ocorrência dos pigmentos em diferentes colorações seja devido à presença de taninos nas diferentes cultivares de sorgo, mas não realizaram a identificação da composição dos pigmentos.

Substâncias adicionadas ao meio de cultura também podem influenciar no processo oxidativo: Cai e Butler (1990) observaram que o aumento da concentração de cinetina induziu maior frequência de formação de calos



embriogênicos em sorgo, mas também aumentou a síntese de pigmentos. O mesmo efeito foi observado quando se aumentou a concentração de sacarose do meio de cultura.

Para prevenir a ocorrência de oxidação, George (1996b) recomenda que se minimizem os danos causados ao explante, removendo os compostos fenólicos produzidos, através da alteração da composição do meio de cultura e a concentração ou tipo de reguladores de crescimento empregados. A remoção dos compostos pode ser feita pela utilização de meios líquidos, de diferentes agentes de solidificação ou pela adição ao meio de substâncias de adsorção.

Para a solidificação do meio de cultura de modo geral utiliza-se o ágar, mas existem indicações de que este também possa causar oxidação. O ágar é o agente solidificante mais utilizado em cultura de tecidos. É constituído de açúcares, galactose e uma fração neutra, a agarose, que possui forte capacidade de geleificar. O ágar possui graus variáveis de pureza, o que influencia na sua capacidade de solidificar e provocar reações com outros agentes no meio de cultura. Contém grande quantidade de sulfatos, os quais são bastante reativos e já se identificou a presença de cobre, elemento capaz de acelerar o processo de oxidação. Alguns tipos de ágar - dependendo do fabricante, além do enxofre, podem ainda conter substâncias fenólicas (George, 1996a). O ágar apresenta também pequenas quantidades de macro e microelementos, especialmente cálcio, potássio e fosfato (Debergh, 1983).

A utilização de outros produtos mais puros como agarose e phytigel não tem apresentado sintomas de indução de oxidação (Finch et al., 1992). A agarose é um produto mais caro em relação ao ágar, porém não possui os grupamentos sulfato, sendo um produto mais puro. Geralmente em meios contendo ágar ocorre oxidação mas, com a adição de outro agente geleificante ao meio, é possível diminuir ou evitar o processo (George 1996b).

Os explantes são menos afetados por oxidação, quando cultivados em meios líquidos, pois nestes os fenóis se difundem rapidamente (George 1996b). Assim, explantes de macieira e diversos gêneros de orquídeas são preferencialmente inoculados em meios líquidos (Zepeda e Sagawa, 1981;

George, 1996b). Collins e Grosser (1984) sugerem, porém, que meios com ágar são preferíveis a meios líquidos por se aproximarem mais das condições naturais.

Objetivou-se, neste trabalho, desenvolver uma metodologia para propagação *in vitro* de estrelicia assim como identificar um método eficiente para controle do processo de oxidação.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA UTILIZANDO GEMAS AXILARES E SEGMENTOS FOLIARES**

#### *5.1.1 Indução de morfogênese ou calogênese em segmentos foliares*

##### **a. Coleta e assepsia**

Folhas jovens, de plantas adultas, mantidas no Viveiro de Plantas Ornamentais da UFLA, foram coletadas, imersas em água destilada e transportadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura, onde as folhas foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 30% (cloro ativo: 2-2,5 %), acrescido de 1,0 g/L de benomyl e 52,0 mg/L de cloranfenicol, por 20 minutos. Em câmara asséptica foram lavadas por 4 vezes em água destilada autoclavada e mantidas em solução contendo 1,0 g/L de PVP 10 (P.M. 10.000). As folhas foram seccionadas em segmentos de tamanhos diferenciados e inoculadas em diferentes posições nos meios de cultura.

## b. Experimentos

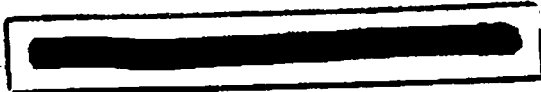
### b.1 Efeito de antioxidantes PVP e carvão ativado, benomyl, cloranfenicol e 2,4-D adicionados ao meio de cultura

No experimento avaliou-se o efeito de concentrações de PVP ou carvão ativado, cloranfenicol, benomyl e 2,4-D, acrescidos ao meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) (Anexo 1), em diferentes combinações, nos seguintes tratamentos:

- meio MS
- MS + 4 mg/L 2,4D
- MS + 52 mg/L de cloranfenicol
- MS + 4 mg/L 2,4 D + 52 mg/L de cloranfenicol
- MS + 2 g/L de carvão ativado + 52 mg/L de cloranfenicol
- MS + 160 mg/L PVP + 52 mg/L de cloranfenicol
- MS + 800 mg/L PVP + 52 mg/L de cloranfenicol
- MS + 800 mg/L PVP + 1 g/L benomyl
- MS + 2 g/L de carvão ativado + 1 g/L benomyl
- MS + 800 mg/L PVP + 52 mg/L de cloranfenicol + 1 g/L benomyl
- MS + 2 g/L de carvão ativado + 52 mg/L de cloranfenicol + 1 g/L benomyl

### b.2 Efeito do meio de Ziv e Halevy

Os segmentos foliares foram inoculados no meio recomendado por Ziv e Halevy (1983) (Anexo 2), com a seguinte composição: meio MS acrescido de 52 mg/L de cloranfenicol, 25 mg/L de oxitetraciclina, 10 g/L de carvão ativado, 2,5 mg/L de AIB, 1 mg/L de ANA, 5 mg/L de cinetina, 0,5 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar.



### b.3 Efeito do meio B5

Os segmentos foliares também foram inoculadas em meio B5 (Gamborg et al., 1968) (Anexo 1) acrescido de 400 mg/L PVP ou 1 g/L de carvão ativado.

Em todos estes experimentos, utilizaram-se 10 mL de meio em cada tubo de ensaio e o pH foi ajustado em 5,8. Realizou-se a autoclavagem a 121°C, 1 atm de pressão por 20 minutos. Após inoculação em câmara asséptica, os explantes foram mantidos em câmaras tipo B.O.D., com temperatura 26 °C, no escuro, por 30 dias e então foram transferidos para condições de fotoperíodo de 16 horas de luz, na mesma temperatura, até os 75 dias.

No experimento b1, utilizaram-se 10 tubos por tratamento, em delineamento estatístico inteiramente casualizado. Nos experimentos b2 e b3, foram inoculados 40 tubos de cada, inoculando-se os segmentos foliares de tamanhos variados em diferentes posições: 1 cm<sup>2</sup> e 0,5x2,0 cm dispostos totalmente em contato com o meio ou na posição vertical.

As avaliações foram realizadas periodicamente durante o período experimental, observando possíveis modificações no explante.

#### *5.1.2 Indução de morfogênese em gemas axilares*

Para micropropagação de gemas axilares, utilizou-se a metodologia descrita por Ziv e Halevy (1983): plantas adultas de estrelicia foram coletadas no campo eliminando-se folhas e raízes. Os segmentos remanescentes foram transportados para laboratório e em seguida lavados com água e detergente e mantidos em água corrente por 24 horas. Efetuaram-se novos cortes até obter segmentos de tamanho aproximado de 5 cm, constituídos do pecíolo basal, os quais foram submetidos à desinfestação através de imersão em álcool 70% por 5 minutos e em seguida mantidos em solução contendo hipoclorito de sódio 30% e 1 g/L de benomyl por 15 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram lavados por 4 vezes em água destilada autoclavada e transferidos para solução de antioxidantes, constituída de 50% dos sais do meio MS, excluindo-se as vitaminas e sacarose, sem solidificante e acrescido de 150 mg/L de ácido cítrico, 100 mg/L de ácido ascórbico, 25 mg/L de benomyl, 5 mg/L de cloranfenicol e 5 mg/L de oxitetraciclina. O pH foi ajustado em 4,5 e autoclavou-se por 15 minutos a 121 °C. Os explantes foram mantidos nesta solução por 24 horas, no escuro, à temperatura de 26 °C. Após este período, realizaram-se os cortes para obtenção das gemas, as quais se localizam na intersecção das bases foliares, tendo sido cuidadosamente removidas com auxílio de bisturi e pinça. Utilizaram-se ainda como explantes segmentos da base foliar, da parte interna do caule (segmentos nodais) e de raízes remanescentes. Os explantes foram mantidos em câmara tipo B.O.D., por 10 dias, no escuro, em temperatura de 26 °C. Após este período, os explantes foram transferidos para luz em fotoperíodo de 16 horas. O meio de cultura utilizado foi o MS, acrescido de 10 g/L de carvão ativado, 52 mg/L de cloranfenicol, 2,5 mg/L de AIB, 1 mg/L ANA, 5 mg/L cinetina, 0,5 mg/L de 2,4-D e 7 g/L ágar. O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, realizada por 20 minutos a 121 °C, 1 atm. Além deste meio testou-se também o efeito de PVP (400 mg/L) em substituição ao carvão ativado.

## **5.2 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA UTILIZANDO EMBRIÕES IMATUROS**

### **a. Coleta e extração dos embriões**

Os frutos foram coletados no campo e levados para o laboratório onde foram abertos e retiradas as sementes. Estas foram limpas, eliminando-se o arilo e esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 30%, por 15 minutos, sendo em seguida lavadas 4 (quatro) vezes em água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Com auxílio de um microscópio estereoscópio, os embriões

foram extraídos e inoculados em meio de cultura contendo os tratamentos. O material foi acondicionado em câmaras tipo B.O.D., com temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz.

### *5.2.1 Avaliação do efeito de idade para coleta dos embriões, sacarose e concentrações do meio MS*

Com o objetivo de aumentar a produção de frutos, devido à reduzida ocorrência de polinização natural, as flores de estrelicia foram polinizadas manualmente. As polinizações foram realizadas entre as plantas disponíveis no viveiro de plantas ornamentais da UFLA. Os embriões foram coletados com diferentes idades, em função das datas de polinização, observando-se algumas características morfológicas como cor do arilo, textura do tegumento das sementes, características do endosperma e tamanho do embrião.

Os embriões excisados foram submetidos a diferentes experimentos com o objetivo de avaliar o seu desenvolvimento. Os embriões foram coletados com 8, 12, 16 e 20 semanas após a polinização. No primeiro experimento, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de sacarose: 0; 7,5; 15; 30; 45 e 60 g/L acrescidas ao meio MS, solidificado com 7 g/L de ágar. Em outro experimento, avaliou-se a influência de diferentes concentrações de sais do meio MS: 12,5; 25; 50; 75; 100 e 125 %. As concentrações de mio-inositol (100 mg/L), vitaminas (ácido nicotínico – 0,5 mg/L; piridoxina – 0,5 mg/L; tiamina 0,1 mg/L) e glicina (2 mg/L) foram mantidas sem alteração. A sacarose, neste experimento, foi utilizada a 30 g/L. Em ambos os experimentos o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Cada tubo de ensaio (15 x 250 mm) recebeu 10 mL do meio de cultura.

Após 30 dias efetuaram-se avaliações, observando-se comprimento de brotação e de raiz, formação de calos e ocorrência e coloração de oxidação no meio de cultura e do embrião. Para avaliar a oxidação, atribuíram-se notas, em função da intensidade de oxidação ocorrida no meio, segundo a escala: 0 - Meio

sem oxidação; 1 – 1/3 do meio escurecido; 2 – 2/3 do meio escurecido e 3 – Meio totalmente escurecido.

### *5.2.2 Avaliação do efeito de BAP sobre o desenvolvimento dos embriões*

Os embriões foram extraídos das sementes de estrelicia e inoculados em meio de cultura MS, acrescido de 30 g/L de sacarose e com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, 1 atm, 20 minutos. Ao meio de cultura foram acrescidas as seguintes dosagens de BAP: 0 (controle); 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg/L.

### *5.2.3 Efeito da água de coco, de sulfato de adenina e do meio Knudson no desenvolvimento dos embriões.*

Nestes experimentos, utilizaram-se como tratamentos o meio MS (controle), meio MS acrescido de 200 ml/L de água de coco, meio MS acrescido de 200 ml/L de água de coco e 10 mg/L de sulfato de adenina, meio MS acrescido de 200 ml/L de água de coco e 20 mg/L de sulfato de adenina. Em todos os meios de cultura foram acrescidos 30 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar. Utilizou-se ainda o meio Knudson (Anexo 1), acrescido de 200 ml/L de água de coco, 1 g/L de carvão ativado e 20 g/L de sacarose. O pH dos meios foram ajustados em 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos.

Em todos os experimentos utilizou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 8 repetições e um tubo por parcela. As avaliações foram realizadas após 30 dias, observando-se o desenvolvimento dos embriões.

## 5.3 CONTROLE DE OXIDAÇÃO

*5.3.1 Efeito de PVP:* Os embriões de estrelicia foram inoculados em meio de cultura MS, contendo 30 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar, pH ajustado em 5,8 e acrescido de PVP nas seguintes concentrações: 0 (controle), 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg/L.

*5.3.2 Efeito do carvão ativado:* Ao meio MS adicionou-se 0 (controle); 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 e 10 g/L de carvão ativado. O pH foi ajustado em 6,0 e o meio foi solidificado com 7 g/L de ágar e acrescido de 30 g/L de sacarose.

*5.3.3 Efeito do ácido cítrico e ácido ascórbico:* O meio de cultura básico utilizado foi o MS, solidificado com 7 g/L de ágar acrescido de 30 g/L de sacarose, com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. A este meio de cultura adicionou-se ácido cítrico nas concentrações 0, 100, 150 e 200 mg/L, em todas as combinações possíveis com ácido ascórbico nas concentrações 0, 50, 100 e 150 mg/L.

*5.3.4 Efeito de diferentes concentrações de cisteína:* Utilizou-se como meio de cultura o MS, acrescido de 30 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem (121 °C, 1 atm, 20 minutos). A este meio foi acrescida cisteína nas seguintes concentrações: 0 (controle), 4, 8, 12, 16, 20 e 24 mg/L.

*5.3.5 Efeito de diferentes solidificantes do meio de cultura e de meio líquido:* O meio de cultura básico foi o MS, acrescido de 30 g/L de sacarose, com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem (121 °C, 1 atm por 20 minutos). Os embriões foram colocados em meio MS líquido, utilizando ponte de Heller (Heller, 1949) para sustentação dos explantes e, para a solidificação dos meios, utilizou-se ágar (Merck) a 3,5 g/L e 7,0 g/L (controle); agarose a 4 g/L e phytigel a 6 g/L.



5.3.6 *Efeito dos meios de cultura sem os nutrientes ferro (Fe-EDTA) e cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O):* O meio básico utilizado foi o MS, sendo os tratamentos constituídos de meio MS sem Fe-EDTA, meio MS sem CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, meio MS omitindo-se estes dois elementos e o meio MS completo. Os diferentes meios foram solidificados com 7 g/L de ágar e acrescidos de 30 g/L de sacarose. O pH foi ajustado em 5,8 antes do processo de autoclavagem (121 °C, 1 atm, por 20 minutos).

Todos os experimentos desta fase foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições e um tubo por parcela. Realizaram-se as avaliações aos 30 dias após a instalação dos experimentos, observando-se o desenvolvimento dos embriões. Os tubos foram mantidos em câmaras tipo B.O.D., temperatura de 26°C e fotoperíodo de 16 horas de luz.

As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas, utilizando-se procedimentos não-paramétricos, devido às avaliações terem sido baseadas em características qualitativas através de notas. Como o delineamento empregado em todos os experimentos foi inteiramente casualizado, o teste de igualdade entre tratamentos utilizado foi o de Kruskal-Wallis, o qual é apropriado para este tipo de delineamento (Campos, 1983). Foi considerada a aproximação de Qui-quadrado para grandes amostras. As análises foram feitas no procedimento NPAR1WAY, do software SAS (SAS<sup>®</sup>Institute, 1989).

Em alguns experimentos, os tratamentos estavam arranjados em estrutura fatorial com dois fatores. Nestes casos, optou-se pelo desdobramento da interação entre fatores (cada interação do fatorial passou a corresponder a um tratamento), em todos os casos, sem testar a significância da interação, em virtude de aparentemente não existirem métodos não-paramétricos para a análise de ensaios fatoriais. Assim uma vez detectada diferença significativa entre tratamentos, ocorrendo significância entre tratamentos, testes de Kruskal-Wallis foram efetuados entre médias de um fator, fixando-se níveis de outro fator.

Nos casos em que o fator sob estudo era quantitativo (como concentrações de BAP, por exemplo), adotou-se o procedimento seguinte: ajustaram-se modelos de regressão linear simples, através do método não-paramétrico, apresentado por Hollander e Wolfe (1973), com o coeficiente de regressão testado conforme o teste de Theil. Além disto, a partir da diferença calculada entre os valores ajustados e os observados, os desvios de regressão foram calculados para cada nível de um fator quantitativo sob estudo. Tais desvios foram então submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para verificar se diferiam significativamente dos níveis do fator. Este procedimento propiciou um modo (aproximado) de testar a significância dos desvios de regressão, ou seja, testar se o modelo ajustado era apropriado. Em caso de não o ser, modelos polinomiais de ordem superior foram ajustados pelo método de mínimos quadrados, até que a não significância dos desvios de regressão fosse observada.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA UTILIZANDO GEMAS AXILARES E SEGMENTOS FOLIARES

Não foi observada morfogênese ou calogênese nos explantes gemas axilares ou segmentos foliares, independente do tratamento aplicado. Com estes resultados não foi possível reproduzir o protocolo desenvolvido por Ziv e Halevy (1983), para a propagação *in vitro* de estrelícia, os quais utilizaram como fonte de explante gemas axilares.

Os segmentos foliares não apresentaram contaminação, mas ocorreu intensa oxidação no meio de cultura, ocorrendo exudatos de principalmente coloração azul (Figura 2).



FIGURA 2. Segmentos foliares de estrelícia de diferentes tamanhos e inoculados em diferentes posições. Visualiza-se também a ocorrência de oxidação nas colorações azul e marrom. UFLA, Lavras/MG, 1997.

Quando gemas axilares e segmentos basais do caule foram cultivados, apesar de todo o processo de desinfestação, realizado segundo a metodologia de Ziv e Halevy (1983), ocorreu contaminação em 42% dos explantes. No material remanescente também ocorreu intensa oxidação principalmente de coloração azul. Os explantes não apresentaram resposta alguma a qualquer dos tratamentos aplicados, permanecendo no meio sem alteração, apenas com ligeiro escurecimento após algum tempo.

## **6.2 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE ESTRELÍCIA UTILIZANDO EMBRIÕES IMATUROS**

Na Tabela 1 encontram-se os resultados obtidos nos experimentos de estabelecimento *in vitro* dos embriões, avaliando-se o efeito das diferentes idades para coleta e extração dos embriões em combinação com diferentes concentrações de sacarose e do meio MS e, ainda, o efeito do regulador de crescimento BAP.

TABELA 1. Valores de Qui-Quadrado calculado, conforme o critério de Kruskal-Wallis, para testar a hipótese de igualdade entre tratamentos dos diferentes experimentos em função das características observadas (Tamanho de brotos e de raízes e intensidade de oxidação). UFLA, Lavras/MG, 1997.

<i>Experimentos</i>	<i>Tamanho de Brotos</i>	<i>Tamanho de Raiz</i>	<i>Oxidação</i>
<i>Diferentes idades e concentrações do meio MS</i>	29,322	29,194	39,992 *
<i>Diferentes idades e concentrações de Sacarose</i>	137,550 **	136,260 **	119,980 **
<i>Níveis de BAP</i>	12,318 *	4,373	8,952

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Observa-se na Tabela 1 que, no experimento em que se avaliaram as diferentes idades dos embriões e concentrações do meio MS, houve significância para a característica oxidação, ou seja, existem pelo menos dois tratamentos que diferem entre si, porém não se identificaram diferenças para as características altura de brotos ou formação de raízes. Estes caracteres, além da ocorrência de oxidação, foram significativamente influenciados pelas concentrações de sacarose utilizadas em combinação com as diferentes idades dos embriões. As diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP acrescidas ao meio de cultura influenciaram apenas o tamanho dos brotos formados, não ocorrendo o efeito identificado por Cai e Butler (1990), em sorgo e George (1996b), em diversas outras culturas, os quais observaram influência das concentrações de regulador de crescimento no aumento da oxidação.

### 6.2.1 Efeito de concentrações do meio MS e idades dos embriões

Diferentes concentrações do meio MS, independentemente das épocas de coleta das sementes, não influenciaram o desenvolvimento dos embriões, conforme análise estatística. Observa-se na figura 3 que, em explantes cultivados em meios com 75 e 100 % da concentração do MS, houve um maior desenvolvimento da parte aérea e de raízes, conforme Figura 4. Nestes tratamentos obtiveram-se brotações com até 3,7 cm e raiz com 3,5 cm. Estes valores, porém, não foram suficientes para demonstrar diferença entre tratamentos testados. Assim, não foi possível determinar uma concentração ótima do meio MS para iniciação da cultura. Este resultado indica que, possivelmente, todo o processo de germinação ocorre pelas reservas nutricionais do cotilédone, independente do fornecimento externo.

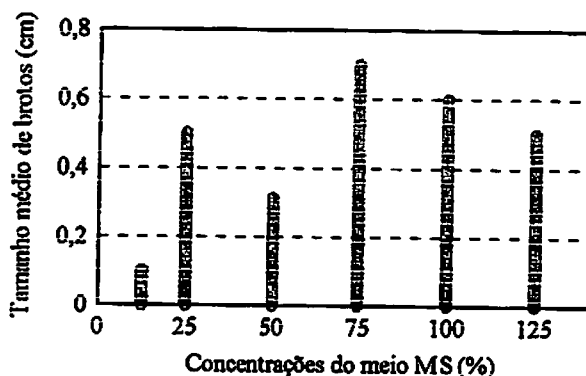
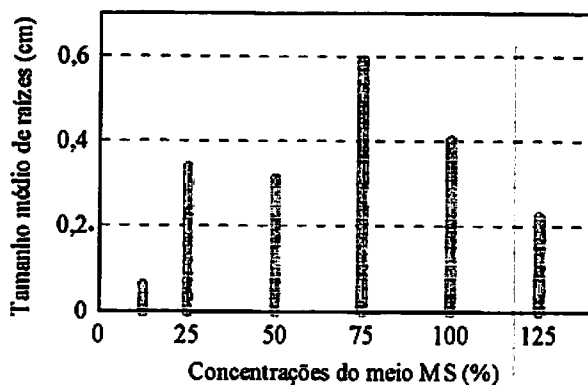


FIGURA 3. Tamanho médio dos brotos formados em embriões de estrelicia cultivados *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1997.



**FIGURA 4.** Tamanho médio de raízes formadas em embriões de estrelicia cultivados *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1997.

O desenvolvimento dos embriões foi influenciado pelas diferentes idades em que foram coletados. A germinação nos embriões ocorreu apenas naqueles coletados com 20 semanas, como se visualiza na Figura 5. Embriões em estágios inferiores de maturidade não apresentaram formação de parte aérea e raízes (Figuras 5 e 6, respectivamente). Embriões com 8 semanas não apresentaram sinal algum de desenvolvimento, mas já os embriões coletados com 12 ou 16 semanas apresentaram inchamento, formando uma estrutura sem forma definida, aparentando embrioides, mas não regeneraram plântulas. O tamanho médio dos brotos e raízes, formadas a partir de embriões de 20 semanas, foi de 0,45 e 0,27 cm, respectivamente, com amplitude entre 0,8 e 4,0 cm para brotos e 0,4 e 3,5 cm para raízes.

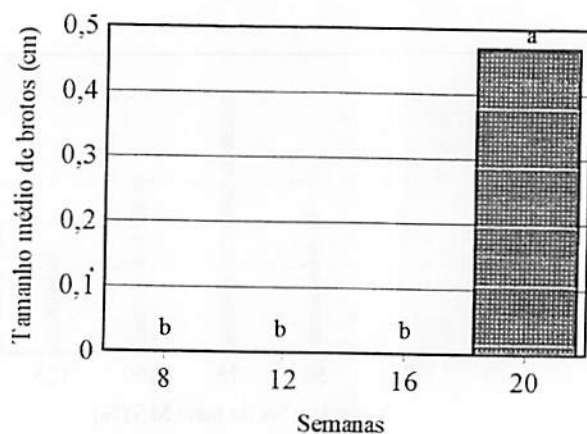


FIGURA 5. Tamanho médio dos brotos formados em embriões de estrelicia cultivados *in vitro* por 30 dias (para todas as concentrações do meio MS) em função das diferentes idades das sementes. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

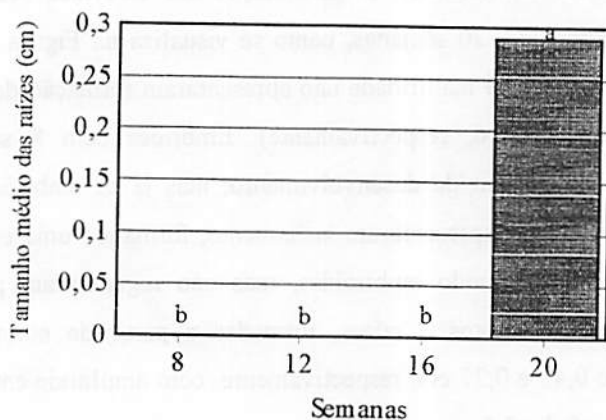


FIGURA 6. Tamanho médio das raízes formadas em embriões de estrelicia cultivados *in vitro* (para todas as concentrações do meio MS) em função das diferentes idades das sementes, após 30 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.



A Figura 7 demonstra o efeito da interação das idades e das concentrações do meio MS sobre a ocorrência de oxidação no meio de cultura. Para a ocorrência de oxidação, em embriões coletados na 8ª semana, não foi possível obter uma equação que se ajustasse às variações observadas em função dos tratamentos. Observa-se que baixos valores de oxidação foram encontrados tanto em baixa (25%) como em concentração mais elevada do meio MS (100%) e, ao contrário, valores mais altos de oxidação foram observados em baixa concentração do MS (12,5%), concentrações intermediárias (50 e 75%) e concentração mais elevada (125%). Com estes resultados pode-se inferir que, em embriões muito jovens de estrelicia, a intensidade de ocorrência de oxidação é inerente ao embrião e não influenciada pelas concentrações do meio de cultura.

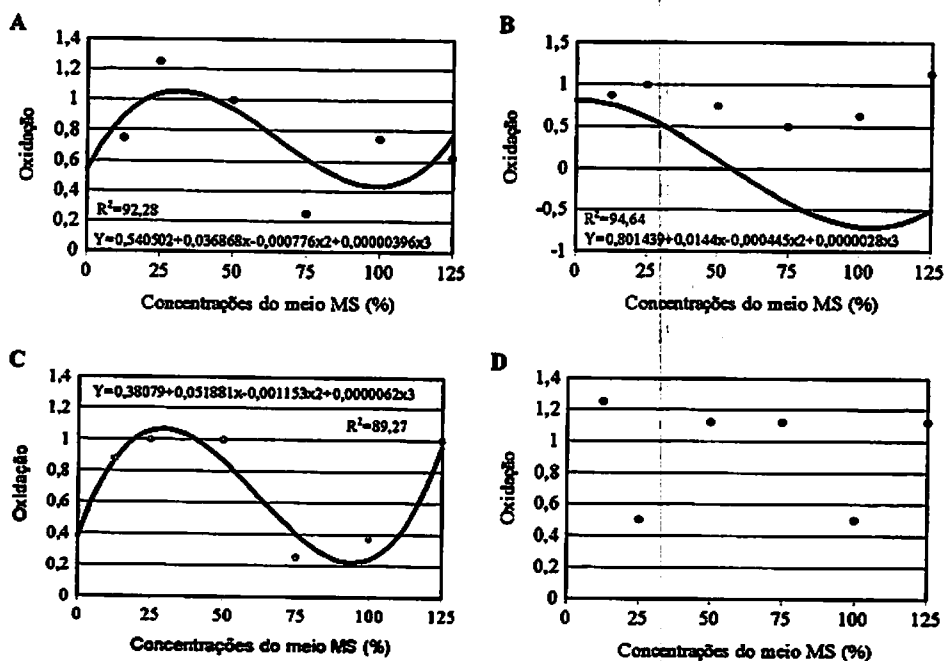


FIGURA 7. Efeito de concentrações do meio MS sobre a ocorrência de oxidação em embriões coletados com a idade de 20 (A), 16 (B), 12 (C) e 8 (D) semanas, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1997.

Nos embriões coletados com 12, 16 e 20 semanas, observa-se tendência de ocorrer menor índice de oxidação quando se utilizou meio MS em sua concentração original. Calculando-se as concentrações ideais, nas quais se observariam menores valores de oxidação, obtiveram-se para 20 semanas, 102,08% do MS; 16 semanas, 86,02% do MS e 12 semanas, 94,42% do MS; demonstrando, assim, que menores valores de oxidação ocorreram quando se utilizou o MS em sua concentração original. Por outro lado, maiores índices de oxidação foram observados em meios com concentração de 25% do MS, sendo os pontos máximos obtidos para 20 semanas a 30,57% do MS; 16 semanas, 19,92% do MS e 12 semanas, 29,52% do MS. Observa-se ainda nos gráficos da Figura 7 pequena tendência de elevação no nível de oxidação em concentrações do meio MS superiores a 100%.

A redução nas concentrações de sais do meio de cultura, conforme sugerido por Jarret, Rodrigues e Fernandez (1985), não demonstrou ser eficiente para controle de oxidação, ao contrário, oxidação em maior intensidade foi observada quando menores concentrações do meio MS foram utilizadas.

A Figura 6 expressa a ocorrência de oxidação em função das diferentes idades de coleta dos embriões. Aparentemente este fator não influenciou o processo oxidativo. Para a ocorrência de menores valores de oxidação a 12 semanas não foi encontrada uma justificativa plausível. Como nas análises se trabalhou com erro de 5%, pode-se atribuir esta variação ao acaso.

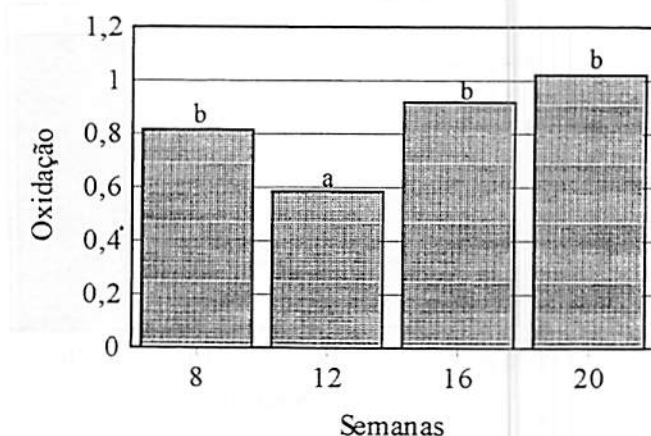


FIGURA 8. Oxidação ocorrida em embriões de estrelicia, após 30 dias de cultivo *in vitro*, em função das diferentes idades das sementes independente das concentrações do meio MS. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

#### 6.2.2 Efeito de concentrações de sacarose e idades dos embriões

Observou-se, neste experimento, influência das concentrações de sacarose no desenvolvimento dos embriões em função de suas diferentes idades de coleta. A formação de parte aérea ocorreu apenas nos embriões coletados com 20 semanas, conforme se verifica na Figura 9, como já observado no experimento anterior (Concentrações do meio MS x Idades do embrião), ocorrendo formação de brotos de tamanho médio igual a 2,27 cm. A amplitude de tamanhos observada variou de 0,5 a 5,7 cm. Raízes foram formadas apenas nos embriões que apresentavam parte aérea, oriundos de sementes coletadas também 20 semanas após a polinização (Figura 10). As raízes apresentaram tamanho médio de 0,78 cm, com amplitude entre 1,0 e 3,5 cm.

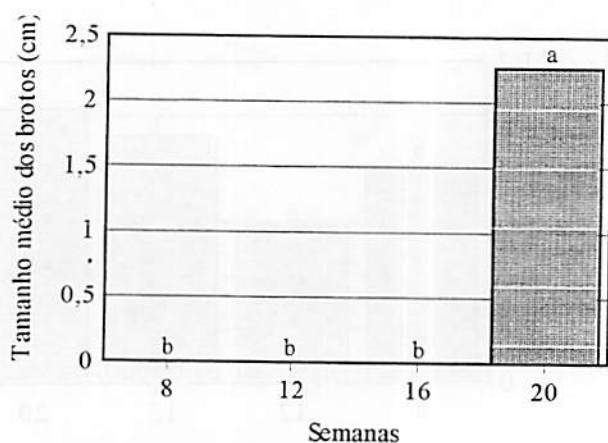


FIGURA 9. Tamanho médio dos brotos formados em embriões de estrelicia, após 30 dias de cultivo *in vitro*, em função das diferentes idades das sementes independente das diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

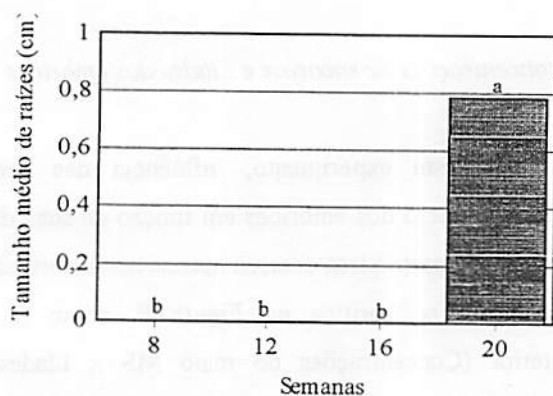


FIGURA 10. Tamanho médio das raízes formadas, após 30 dias de cultivo *in vitro*, de embriões de estrelicia em função das diferentes idades das sementes independente das concentrações de sacarose. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

Estas observações permitem inferir que o desenvolvimento dos embriões de estrelicia em estágios bastante imaturos não é unicamente dependente de fonte energética, mas de algum fator inerente aos embriões, como a presença de algum inibidor ou a falta de competência deste, ou seja, os embriões podem ainda estar numa fase de formação tal que não seja possível o seu desenvolvimento, mesmo com auxílio externo e, assim, apenas o fornecimento de sais e sacarose não são suficientes. A recomendação de aumento das concentrações de sacarose, para estimular a brotação em embriões mais imaturos, conforme sugerido por diversos autores (Collins e Grosser, 1984; Hu e Wang, 1986; Pierik, 1987; Hu e Ferreira, 1990; Saravitz e Raper, 1995; George, 1996a), não foi eficiente para esta espécie.

Os embriões com idade de 20 semanas não exigiram elevação das concentrações de sacarose, ao contrário, melhor desenvolvimento de parte aérea foi obtido com a concentração de 20,64 g/l de sacarose (Figura 11) e de raízes, a 21,39 g/L (Figura 12), o que indica que estes já estejam atingindo o estágio autotrófico, conforme afirmação de Hu e Wang (1986) ou, caso não estejam neste estágio, reforça-se a hipótese de que outro fator do embrião seja responsável por estimular a germinação. Observou-se ainda nas Figuras 11 e 12 que o desenvolvimento dos embriões foi limitado, praticamente não ocorrendo, na ausência de sacarose ou na concentração mais elevada utilizada (60 g/L).

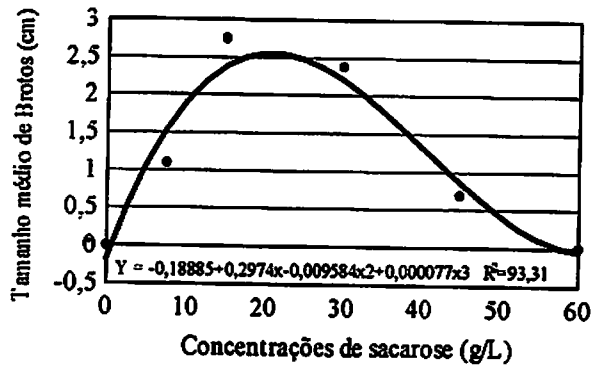


FIGURA 11. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na formação de brotos em embriões de estrelicia coletados com a idade de 20 semanas, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1997.

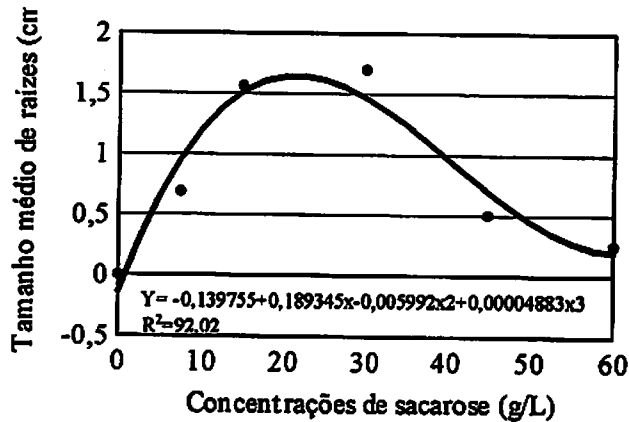


FIGURA 12. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na formação de raízes em embriões de estrelicia coletados com a idade de 20 semanas, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1997.

O processo de oxidação ocorreu de forma mais intensa nos embriões de 20 semanas conforme se observa na Figura 13. Esta observação pode ser atribuída ao fato de que os embriões mais jovens, muitas vezes, não apresentavam desenvolvimento algum, permanecendo no meio da forma como foram inoculados. Nestes não houve oxidação. Ao contrário, os embriões que apresentavam inchamento ou formação de estrutura semelhante a calos, através de seu metabolismo, liberaram exudatos ao meio.

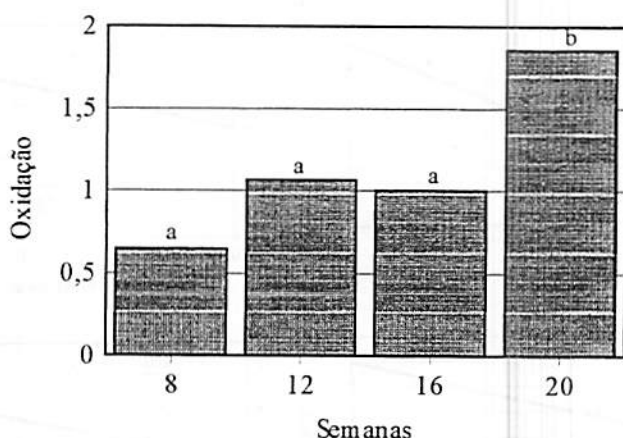


FIGURA 13. Oxidação ocorrida em embriões de estrelicia, após 30 dias de cultivo *in vitro*, independente das diferentes concentrações de sacarose em função das idades das sementes. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

Estas observações permitem inferir que a oxidação está diretamente relacionada ao metabolismo do embrião, ou seja, embriões que formavam parte aérea apresentavam maior oxidação em relação aos que não desenvolviam. Por identificações visuais observou-se, ainda, que aqueles embriões que formavam parte aérea mais rapidamente apresentavam menor intensidade de oxidação em relação aos que demoravam mais, mas após desenvolvidas as plantas, as diferentes intensidades de coloração do meio tenderam a se igualarem.

Avaliando a ocorrência de oxidação no meio de cultura de explantes cultivados em diferentes níveis de sacarose, observa-se, na Figura 14, que a intensidade de oxidação tende a aumentar, à medida que se elevam as concentrações de sacarose, independente da idade dos embriões, concordando com os resultados de Cai e Butler (1990), os quais também observaram aumento na oxidação de sorgo em função da presença de maiores concentrações de sacarose.

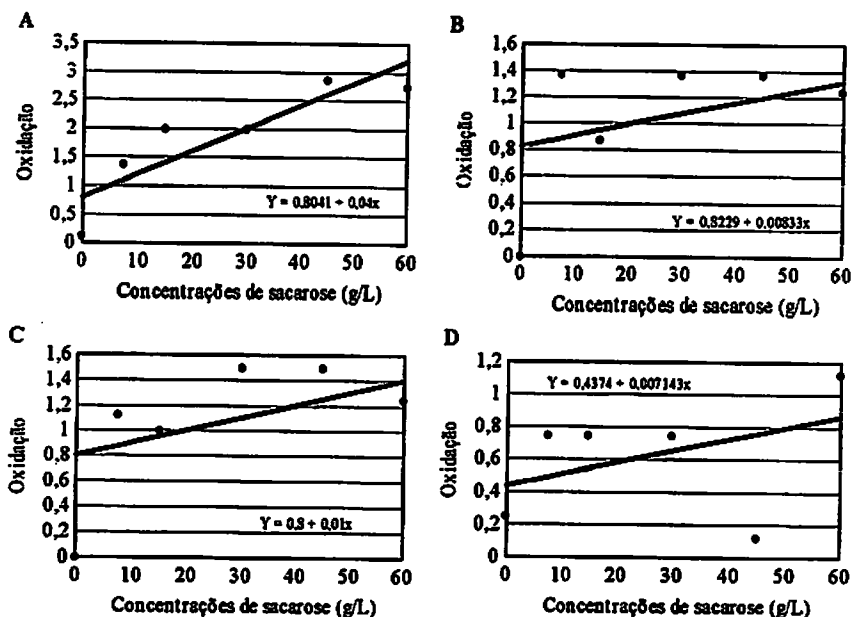


FIGURA 14. Efeito de sacarose na oxidação de embriões de estrelicia coletados com a idade de 20 (A), 16 (B), 12 (C) e 8 (D) semanas, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1997.

A idade de coleta foi um fator importante e primordial para o desenvolvimento dos embriões. Quando extraídos após 20 semanas, originaram plantas completas e bem formadas, mas quando retirados em idade inferior a 20 semanas, independentemente dos tratamentos aplicados, formaram calos ou





estruturas semelhantes a embrióides, dos quais não foi possível regenerar plantas (Figura 15), apesar de várias tentativas com transferências para meios com várias combinações de reguladores de crescimento. Ziv e Halevy (1983) também não conseguiram a regeneração de calos de estrelicia após inúmeras tentativas.

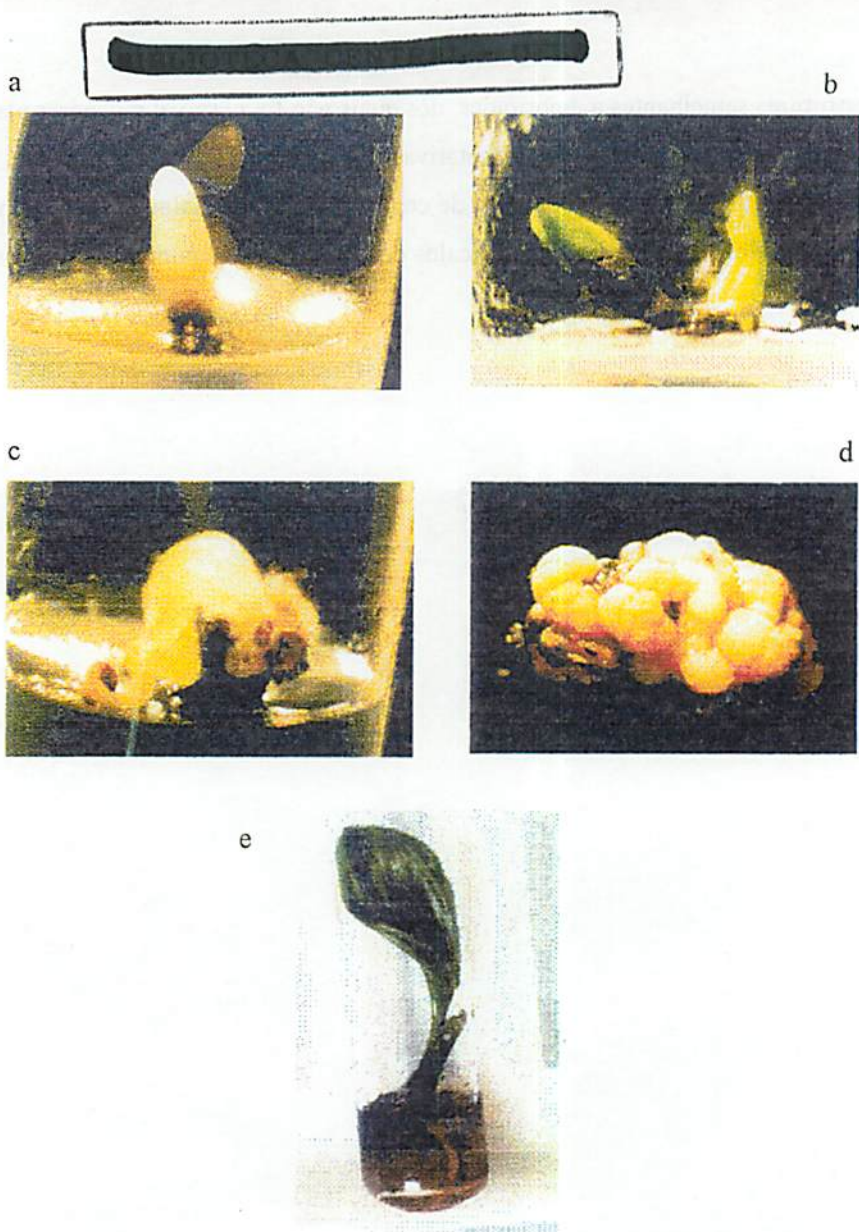


FIGURA 15. Aspecto visual do desenvolvimento *in vitro* de embriões de estrelicia. a) Embrião recém inoculado; b) Embrião em início de brotação; c) Embriões; d) Calos e e) Planta completa. UFLA, Lavras/MG, 1997.

### *6.2.3 Efeito do regulador de crescimento BAP sobre o desenvolvimento dos embriões*

O BAP, nas concentrações utilizadas, não estimulou a formação de maior número de brotos ou outras estruturas como embrióides, ocorrendo apenas a germinação da parte aérea do embrião. O tamanho dos brotos formados foi influenciado pelos níveis de BAP utilizados. Queda sistemática na altura destes brotos foi observada, à medida que se aumentaram as dosagens do regulador, conforme demonstrado na Figura 16. Brotos de maiores tamanhos médios (1,15 e 1,22 cm) foram obtidos, respectivamente, em meios onde se utilizaram 0,5 mg/L de BAP ou na ausência deste, sugerindo que a adição de baixas concentrações de BAP podem ser benéficas para o desenvolvimento da parte aérea. A amplitude dos brotos formados variou de 1,0 a 2,5 cm, na ausência de BAP e de 0,7 a 4,0 cm com 0,5 mg/L do regulador de crescimento. A utilização de BAP não promoveu diferenças no tamanho de raízes, ou seja, o desenvolvimento radicular ocorreu independente da presença de BAP no meio de cultura (Figura 17). A ocorrência de oxidação também não foi afetada pela presença do regulador de crescimento no meio de cultura, diferindo das observações de Cai e Butler (1990), os quais encontraram aumento de oxidação do meio devido à adição de regulador de crescimento.

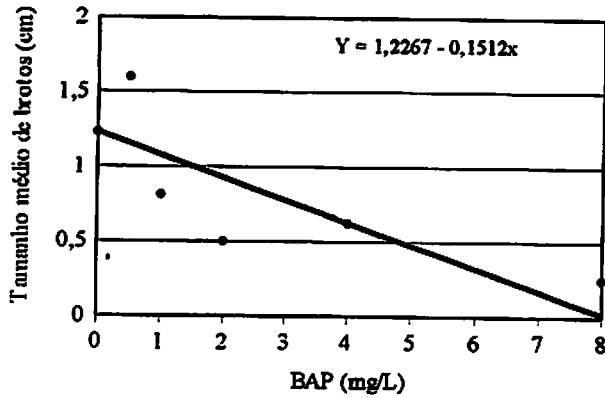


FIGURA 16. Efeito do BAP sobre o tamanho médio de brotos formados em estrelicia, decorrente da germinação de embriões, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1997.

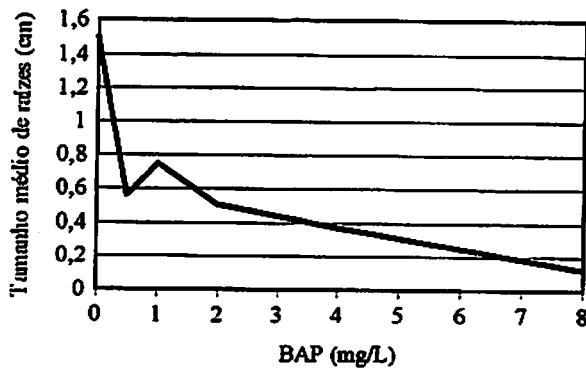


FIGURA 17. Efeito do BAP sobre o tamanho médio de raízes formadas em brotos de estrelicia, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1997.

### 6.3 CONTROLE DE OXIDAÇÃO

Na tabela 2 estão apresentados os resultados do teste estatístico, realizado para detectar diferenças entre os tratamentos aplicados, com o objetivo de evitar ou controlar o processo de oxidação.

TABELA 2. Valores de Qui-Quadrado calculado, conforme o critério de Kruskal-Wallis, para testar a hipótese de igualdade entre tratamentos. UFLA, Lavras/MG, 1997.

<i>Experimentos</i>	<i>Tamanho de Brotos</i>	<i>Tamanho de Raiz</i>	<i>Oxidação</i>
<i>PVP</i>	7,00	7,00	15,9470 *
<i>Cisteína</i>	3,7916	4,0343	4,6822
<i>Carvão Ativado</i>	0	0	32,1010 **
<i>Ácido cítrico x Ácido ascórbico</i>	0	1,9824	3,1644
<i>Água de Coco</i>	0	6,3926	7,9171 †
<i>Exclusão de cobre e ferro</i>	1,2781	1,0714	9,6982 *
<i>Solidificantes</i>	11,081 **	8,2038 †	15,605 *

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

† Significativo ao nível de 10% de probabilidade

Pelos resultados apresentados na Tabela 2, variações no desenvolvimento das plântulas (tamanho de brotos e de raiz) ocorreram apenas

em função dos diferentes solidificantes do meio de cultura utilizados. Diferenças no controle ou redução da oxidação foram observadas, quando se utilizou PVP, carvão ativado, água de coco, solidificantes ou pela exclusão de nutrientes do meio de cultura. O uso de cisteína e ácido ascórbico em combinação com ácido cítrico, nas dosagens testadas, não apresentou efeito sobre o controle de oxidação.

A utilização de carvão ativado não proporcionou diferenças quanto ao desenvolvimento dos embriões, conforme é sugerido por George (1996a), mas as diferentes dosagens testadas promoveram variações quanto à inibição do processo de oxidação. A observação de ocorrência de oxidação foi dificultada pela coloração escura do meio. Identificou-se formação de oxidação pela presença de regiões com coloração escura mais intensa próximo ao explante. Em meios com maiores níveis de carvão ativado, a observação foi ainda mais difícil. Pelos resultados, não se pode afirmar com certeza que os baixos valores de oxidação encontrados nestes tratamentos possam ser atribuídos ao efetivo controle do processo pela presença de carvão ativado, pois pode ter ocorrido oxidação e que não tenha sido perfeitamente visualizada devido à coloração do meio.

Na Figura 18 observa-se uma diminuição de oxidação, à medida em que foram aumentadas as concentrações de carvão ativado. O processo de escurecimento ocorreu com maior intensidade em meios com baixa concentração, 0,5 – 1,0 g/L, ou na ausência desta substância.

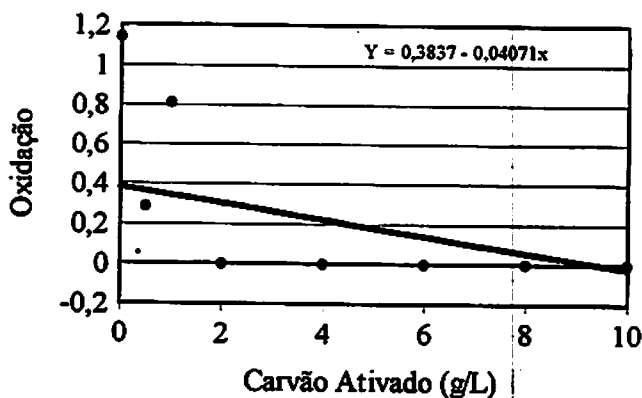


FIGURA 18. Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado sobre o controle de oxidação no cultivo *in vitro* de embriões de estrelicia. UFLA, Lavras/MG, 1997.

Avaliando o comportamento dos embriões cultivados em meio Knudson e a adição de água de coco e sulfato de adenina ao meio MS, pode-se observar menor intensidade de oxidação quando se utilizou meio Knudson (Figura 19). Os diferentes meios não influenciaram o desenvolvimento dos explantes, ocorrendo formação de parte aérea e raízes nos embriões cultivados tanto em meios considerados fortes como o MS, ou fracos como o de Knudson. A água de coco não alterou o desenvolvimento dos embriões conforme sugerido por George (1996a).

Nos tratamentos cujos embriões foram cultivados no meio MS, independente das substâncias adicionadas a este, ocorreu oxidação no meio de cultura com maior intensidade em relação aos meios cujos explantes foram cultivados no meio Knudson. Dentre estes, maior intensidade de oxidação ocorreu no meio MS acrescido de 20 mg/L de sulfato de adenina. Apesar do meio Knudson ter apresentado melhor eficiência em relação ao MS para controle de oxidação, é necessário o aprofundamento de estudos com objetivo de identificar fatores que possam estar influenciando este processo, pois a simples redução na concentração dos nutrientes do meio MS não proporcionou este

efeito e o meio Knudson apresenta concentrações de sais bastante reduzidas (Figura 19).

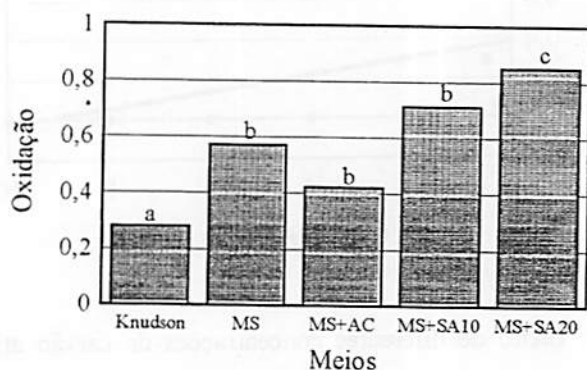


FIGURA 19. Oxidação ocorrida em meio de cultura Knudson e MS, acrescido ou não de água de coco e de sulfato de adenina, após 30 dias de cultivo *in vitro* de embriões de estrelicia. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

A adição de PVP ao meio de cultura, em diferentes concentrações, não gerou variações no desenvolvimento dos embriões, principalmente em concentrações mais elevadas as quais não causaram toxidez. Observa-se, na Figura 20, que o PVP não foi eficiente para controle de oxidação, apesar de sua maior efetividade já comprovada em outras culturas (Fridborg e Eriksson, 1965; Anagnostakis, 1974; Fridborg et al., 1978; Tisserat, 1979; Takayama e Misawa, 1980; Ziv e Halevy, 1983; Bom, Gendraud e Franclet, 1988; Guerra e Handro, 1988), observando-se ainda uma tendência de ocorrer oxidação com maior intensidade em concentrações mais altas de PVP.



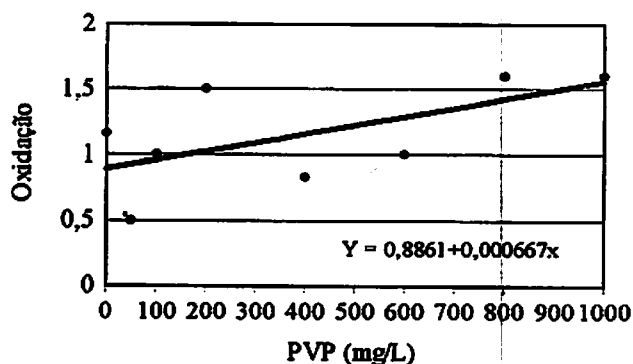


FIGURA 20. Efeito de PVP sobre o controle de oxidação em embriões de estrelicia cultivados *in vitro*, após 30 dias. UFLA, Lavras/MG, 1997.

A utilização de diferentes solidificantes para o meio de cultura influenciou tanto o desenvolvimento dos embriões quanto o controle de oxidação. Em meios líquidos ou contendo 3,5 g/L de ágar, os embriões apresentaram formação de parte aérea de tamanhos inferiores aos formados nos outros tratamentos. A utilização de ágar (7 g/L), agarose e phytigel promoveram a formação de brotos em tamanhos estatisticamente iguais entre si, mas superiores aos dos outros tratamentos (Figura 21). No meio solidificado com agarose, os brotos apresentavam tamanho médio de 3,18 cm com amplitude variando de 3,0 a 8,5 cm aos 30 dias. Szabados et al. (1991) também observaram que plantas de mandioca e arroz apresentaram regeneração significativamente maior em meios solidificados com agarose e gelrite em comparação aos meios de ágar.

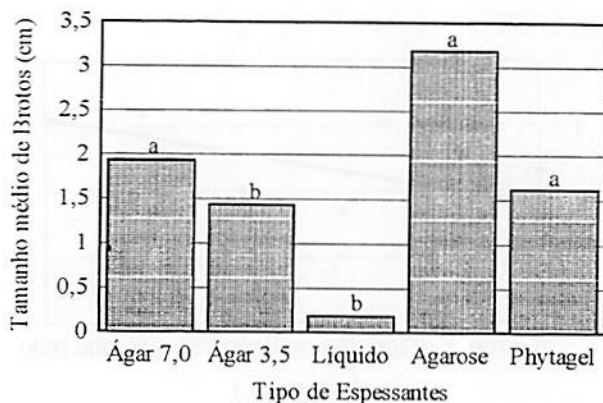


FIGURA 21. Tamanho médio dos brotos formados em embriões de estrelicia cultivados em meios contendo diferentes tipos de espessantes, após 30 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

A formação de raízes foi inferior no meio líquido e superior para os embriões cultivados em meios sólidos. Raízes de maiores tamanhos foram obtidas nos meios solidificados com ágar em relação aos meios de agarose ou phytigel (Figura 22).

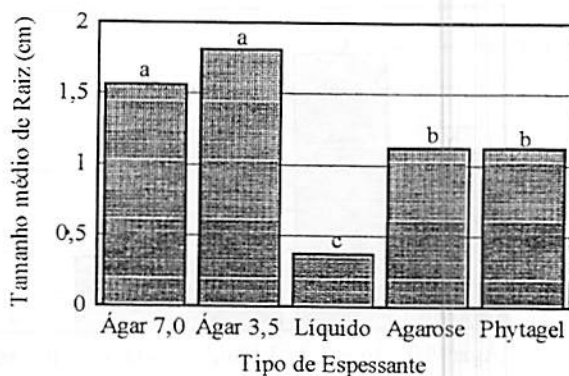


FIGURA 22. Tamanho médio das raízes formadas em embriões de estrelicia cultivados em meios de cultura contendo diferentes tipos de espessantes, após 30 dias de incubação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

A oxidação foi sensivelmente reduzida nos meios solidificados com phytigel e agarose (Figura 23), possivelmente pelo fato destes serem produtos mais puros em relação ao ágar, não apresentando elementos que favorecem a oxidação conforme já sugerido por Finch et al. (1992). Oxidação em maior intensidade foi observada em meios líquidos e solidificados com ágar.

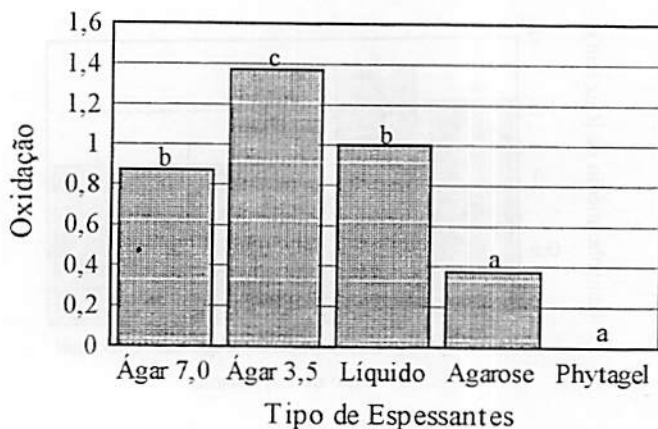


FIGURA 23. Oxidação ocorrida em meios de cultura contendo diferentes tipos de espessantes, após 30 dias de cultivo *in vitro* de estrelicia. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

Observou-se que a utilização de meios líquidos ou semi-sólidos (3,5 g/L de ágar) não foi satisfatória para o desenvolvimento das brotações. Em meio líquido, a parte aérea, possivelmente pela posição de fixação do embrião, tendeu a desenvolver-se internamente à ponte de Heller, produzindo uma plântula deformada. Além disto, este meio, assim como o meio semi-sólido não foi eficiente para controle ou diminuição do processo de oxidação como era esperado, pois conforme George (1996b), os meios líquidos, em função da maior difusão dos exudatos, são favoráveis para reduzir os efeitos maléficos da oxidação, pois evitam que as substâncias liberadas permaneçam junto ao explante, causando toxidez.

A oxidação foi praticamente controlada nos meios cujos solidificantes utilizados foram o phytigel e a agarose. Estas substâncias, conforme George (1996a), são mais puras, não apresentando outros elementos químicos ou compostos fenólicos na sua composição como é o caso do ágar (Debergh, 1983). O desenvolvimento da parte aérea nos meios com agarose e phytigel foi semelhante a dos embriões inoculados em meio com 7 g/L de ágar. O

crescimento de raízes nestes meios foi ligeiramente inferior ao das plântulas desenvolvidas em ágar. Este fator porém não é de importância primordial, devendo-se destacar, sim, a altura da parte aérea e o controle de oxidação. As plantas, porém, após transferidas para meio solidificado com phytigel apresentaram, em menor escala, oxidação, demonstrando que o phytigel é importante para controle de oxidação na fase inicial de desenvolvimento dos embriões (Figura 24).

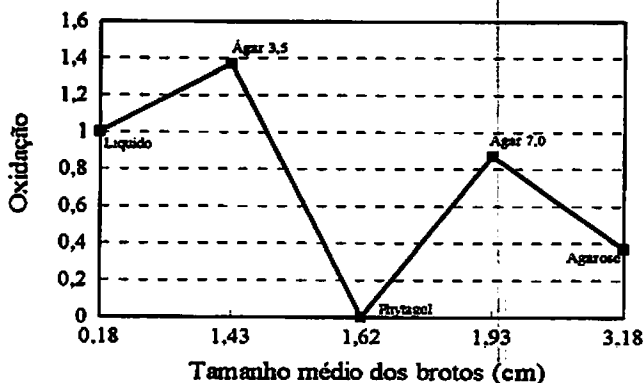


FIGURA 24. Tamanho médio dos brotos formados em embriões de estrelicia e oxidação ocorrida no cultivo *in vitro* em função de diferentes solidificantes utilizados no meio de cultura. UFLA, Lavras/MG, 1997.

A exclusão de nutrientes com função redutora do meio de cultura promoveu variações no controle do processo oxidativo. Meios sem o elemento cobre, conforme se visualiza na Figura 25, apresentaram oxidação em valores significativamente inferiores em relação aos dos outros meios testados. A exclusão de ferro, mesmo associada à exclusão de cobre, não provocou alteração no processo, resultados que se compararam à testemunha - meio MS contendo ambos os nutrientes. A exclusão destes nutrientes não alterou o desenvolvimento

dos explantes, conforme se verifica nas Figuras 26 e 27, não ocorrendo diferença significativa entre o tamanho dos brotos e raízes formados.

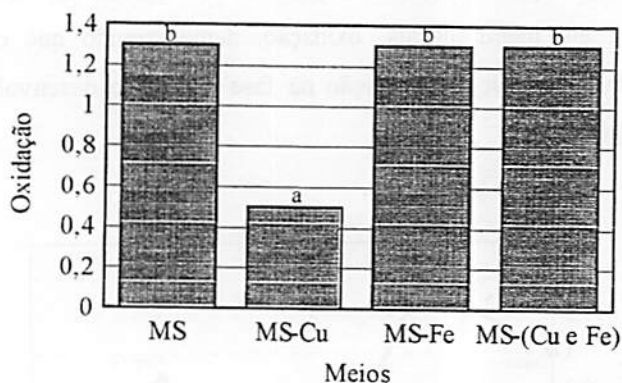


FIGURA 25. Efeito da exclusão dos nutrientes ferro (Fe) e cobre (Cu) do meio de cultura sobre o controle de oxidação em estrelícia, após 30 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. UFLA, Lavras/MG, 1997.

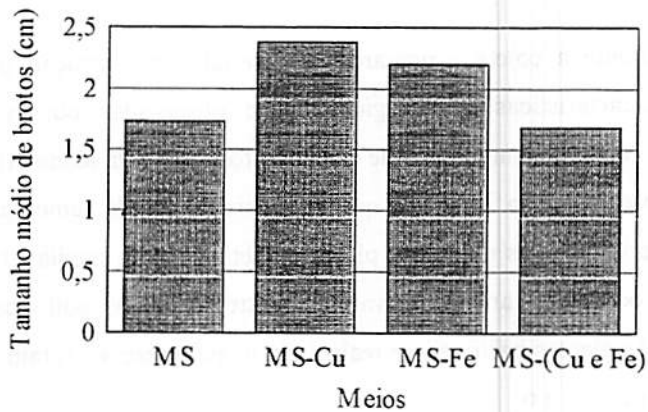


FIGURA 26. Efeito da exclusão dos nutrientes ferro (Fe) e cobre (Cu) do meio de cultura sobre o tamanho médio de brotos formados em estrelicia, após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras/MG, 1997.

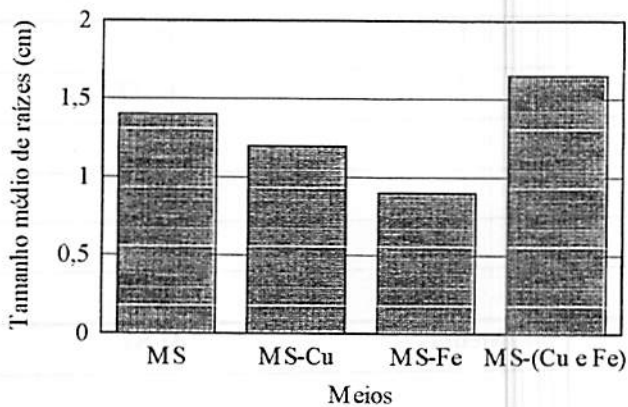


FIGURA 27. Efeito da exclusão dos nutrientes ferro (Fe) e cobre (Cu) do meio de cultura sobre o tamanho médio de raízes formadas em estrelicia, após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras/MG, 1997.

## 6.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Durante a coleta e preparo do material para extração dos embriões, algumas características morfológicas foram observadas objetivando, assim, auxiliar na coleta e identificação de outros frutos dentro da idade ótima.

Observa-se, na Tabela 3, que o número médio de sementes obtidas por fruto é variável com as diferentes plantas. Obteve-se em média 41,87 sementes por fruto, ocorrendo amplitude variável entre os frutos colhidos de 5 a 72 sementes. As plantas nas quais se realizaram as polinizações foram identificadas com números de 1 a 6.

TABELA 3. Número médio de sementes obtidas por fruto, segundo a planta mãe. UFLA, Lavras/MG, 1997.

<i>Planta</i>	<i>Número de Sementes</i>
1	41,72
2	49,37
3	41,38
4	29,76
5	38,18
6	50,79
<b>Média</b>	<b>41,87</b>

As colorações do arilo e do tegumento da semente variaram de acordo com a idade dos mesmos. Conforme se visualiza na tabela 4, com 8 semanas o arilo das sementes apresenta-se branco. Ao longo do tempo adquire colorações amareladas até atingir, com 20 semanas (idade a partir da qual se deve coletar os frutos) a coloração alaranjada, a qual não se altera mais. O tegumento da semente também sofre alterações na coloração em função da idade. Com 8 semanas apresenta-se de cor bege em tom claro e, com o tempo, este tom escurece até atingir coloração ligeiramente amarronzada a 20 semanas (Figura



28), a partir da qual inicia-se o aparecimento de rajas acinzentadas, as quais aumentam até o tegumento tornar-se totalmente negro.



FIGURA 28. Aspecto visual de um fruto e sementes de estrelícia, mostrando diferentes colorações do tegumento e arilo. UFLA, Lavras/MG, 1997.

Os embriões não apresentam variações no formato (cordiforme, torpedo, etc.) conforme já descritos para outras espécies (Pasqual e Pinto, 1989). Estes possuem forma de bastão desde estágios mais imaturos e apenas se desenvolvem em comprimento até atingirem o tamanho de 7-8 mm, quando estabilizam, conforme se visualiza na Tabela 4 e Figura 29. A Tabela 4 apresenta ainda algumas características morfológicas observadas nas sementes de estrelícia.

TABELA 4. Características morfológicas observadas para as sementes de estrelicia em função da época de coleta. UFLA, Lavras/MG, 1997.

<i>Semanas</i>	<i>Arilo</i>	<i>Endosperma</i>	<i>Tegumento</i>	<i>Tamanho do Embrião</i>
8	Branco	Líquido	claro	2-3 mm
12	Amarelo	Pastoso	claro	4-5 mm
16	Amarelo escuro	Pastoso a rígido	claro	5-6 mm
20	Laranja	Rígido	Marrom a cinza	7-8 mm
> 20	Laranja	Rígido a seco	Cinza escuro a preto	7-8 mm

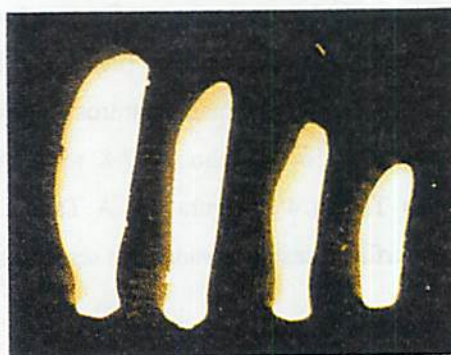


FIGURA 29. Aspecto visual de embriões de estrelicia coletados a 20, 16, 12 e 8 semanas após a polinização. UFLA, Lavras/MG, 1997.

O endosperma da semente é inicialmente líquido e adquire consistência com o tempo até tornar-se rígido, bastante seco.

Em função da idade ótima determinada pelos experimentos que avaliaram esta característica, pode-se determinar como ideal, sementes que

apresentam tegumento amarronzado, com ou sem a presença de rajadas acinzentadas e com arilo de coloração alaranjada. O endosperma deve estar rígido e os embriões apresentarem-se com 7-8 mm. Não foi possível determinar característica alguma para identificação dos frutos que, com idade superior a 20 semanas, tendem a apresentar enrugamento, característica que se intensifica com o tempo, mas não presente ainda nos frutos de 20 semanas.

Nos tubos que apresentaram oxidação, esta ocorreu em diferentes colorações conforme a Tabela 5. As variações na ocorrência de diferentes cores podem ser correlacionadas com a origem das plantas (Cai e Butler, 1990). Pela avaliação de Qui-quadrado (Tabela 5), observa-se que há diferenças entre as cores apresentadas em função da planta que originou as sementes, independente do cruzamento realizado. Maiores estudos, no entanto, serão necessários com o intuito de identificar o fator que controla este efeito. Cai e Butler (1990), por exemplo, identificaram o teor de taninos como o fator responsável pela variação de cores de oxidação observada em sementes de diferentes variedades de sorgo.

**TABELA 5.** Coloração dos exudatos presentes no meio de cultura de cultivo de estrelicia, em número de ocorrências, em função da planta de origem das sementes. UFLA, Lavras/MG, 1997.

<i>Planta</i>	<i>Azul ou Lilás</i>	<i>Marrom</i>	<i>Preto</i>
1	41	29	31
2	24	28	34
3	37	41	26
4	42	27	11
5	26	7	57
6	46	16	40
<b>Total</b>	<b>216</b>	<b>138</b>	<b>199</b>

$$\chi^2 = 95,36 *$$

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições em que os trabalhos foram realizados conclui-se que:

- Não é possível propagar a estrelicia através de segmentos foliares ou gemas axilares.
- Consegue-se o desenvolvimento *in vitro* de plantas completas utilizando como explantes embriões imaturos.
- A idade ótima de coleta das sementes para extração dos embriões é de 20 semanas após a polinização. Morfologicamente as sementes apresentam arilo de coloração alaranjada e os frutos estão iniciando o processo de enrugamento.
- Embriões imaturos com idade inferior a 20 semanas não germinam mesmo em presença de valores elevados de sacarose. O nível ótimo de sacarose para o desenvolvimento dos embriões de 20 semanas é de 20,64 g/L.
- Variações nas concentrações do meio MS não alteram o desenvolvimento dos embriões, mas menores intensidades de oxidação ocorrem em meios com concentração do MS próxima da original.
- A utilização do regulador de crescimento BAP não altera o processo de oxidação, mas plantas de maior tamanho são formadas na sua ausência ou quando se utiliza 0,5 mg/L no meio de cultura.
- Para controle de oxidação maior eficiência é observada em meios onde se adiciona carvão ativado em concentrações superiores a 2 g/L em meios solidificados com o produto phytigel.
- O PVP quando adicionado na concentração 50 mg/L auxilia no controle da oxidação.
- A utilização dos produtos cisteína, ácido cítrico, ácido ascórbico, não é eficiente para controlar a oxidação.
- A exclusão de cobre do meio de cultura também auxilia na redução de oxidação no meio de cultura.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAGNOSTAKIS, S.L. Haploid plants from anthers of tobacco - Enhancement with charcoal. *Planta*, v.115, p.281-283, 1974.
- BON, M.C.; GENDRAUD, M.; FRANCKET, A. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and nature clones of *Sequoiadendron giganteum*: influence of activated charcoal. *Scientia Horticulturae*, v.34, n.3/4, p. 283-291, 1988.
- CAI, T.; BUTLER, L. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.20. p.101-110. 1990.
- CAMPOS, H. de. *Estatística experimental não-paramétrica*, 4 ed. Piracicaba, 1983. 349p.
- CHANG, B.K.W.; CRILEY, R.A. Clonal propagation of Pink Ginger in vitro. *HortScience*, v.28, n.12, p.1203, 1993.
- COLLINS, G.B.; GROSSER, J.W. Culture of embryos. In: VASIL, I.K. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, v.1. Orlando: Academic Press, p.241-257, 1984.
- COMPTON, M.E.; PREECE, J.E. Effects of phenolic compounds on tobacco callus and blackberry shoot cultures. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v.113, n.1, p.160-163, 1988.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, v.59, p.270-276, 1983.
- DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. *Plant biochemistry*. San Diego: Academic Press, 1997. 554 p.
- FINCH, R.P.; BASET, A.; SLAMET, I.H.; COCKING, E.G. In vitro shoot culture of wild *Oryza* and othergrass species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.30, p.31-39, 1992.
- FRIDBORG, G.; ERIKSSOM, T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. *Physiologia Plantarum*, v.34, p.306-308, 1965.

- FRIDBORG, G.; PEDERSON, M.; LANDSTROM, L.E.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites, inhibition of morphogenesis. *Physiologia Plantarum*, v.43, p.104-106, 1978.
- GAMBORG, O.L. et al. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exptl. Cell Res.*, v.50, p.151-158, 1968.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture, part 1 – The Technology**, 2 ed. Edington: Exegetics Limited, 1996a, 1574 p.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture, part 2 - In Practice**, 2 ed. Edington: Exegetics Limited, 1996b, 1361p.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture – Handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics Limited, 1984. 593p.
- GOULD, J.H.; MURASHIGE, T. Morphogenic substances released by plant tissue cultures. I. Identification of berberine in *Nandina* culture medium, morphogenesis and factors influencing accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.4, n.1, p.29-42, 1985.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart (Palmae). *Plant Cell Reports*, v.7, p.550-552, 1988.
- HELLER, R. Sur l'emploi de papier filtre sans cendres comme support pour les cultures de tissus végétaux. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v.143, p.335-337, 1949.
- HOLLANDER, M.; WOLFE, D.A. **Nonparametric statistical methods**. New York: John Wiley e Sons, 1973. 503p.
- HU, C.; WANG, P. Embryo culture: technique and application. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. (eds.) **Handbook of plant cell culture, v.4 – Technique and applications**. New York: Macmillan Publishing Company, 1986. p.43-96.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH-ABCTP, 1990. P.71-86.
- JARRET, R.L.; RODRIGUEZ, W.; FRENANDEZ, R. Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' plantains in Costa Rica. *Scientia Horticulturae*, v.25, p.137-147, 1985.

- KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.H.; MROGINSKI, L.A., eds. *Cultivo de tejidos em la agricultura – Fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT, 1991. p.41-78.
- LITZ, R.E. Cultivo de embriones y óvulos. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A., eds. *Cultivo de Tejidos em la Agricultura – Fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura tropical, 1993, p.295-312.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- OVERBEEK, J. Van; CONKLIN, M.E.; BLALESLEE, A.F. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, v.94, p.350-351, 1941
- PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. *Cultura de embriões*. Brasília: ABCTP Notícias, p.2-12, 1989.
- PIERIK, R. L. M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- PIERIK, R.L.M. *Culivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.
- PREECE, F.E.; COMPTON, M.E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 17 - High-Tech and Micropropagation I*. Berlin: Spring Verlag, 1991. p.168-189.
- SAMARTIN, A. A comparative study of effects of nutrient media and cultural conditions on shoot multiplication of *in vitro* cultures of *Camellia japonica* explants. *Journal of Horticultural Science*, v.64, n.1, p.73-79, 1989.
- SARAVITZ, C.H.; RAPER Jr. C.D. Responses to sucrose and glutamine by soybean embryos grown in vitro. *Physiologia Plantarum*, v.93, p.799-805, 1995.
- SAS INSTITUTE INC. *SAS Procedures Guide for computers*. v.3, 6, ed. Cary NC; SAS Institute Inc., 1993, 373p.
- SIQUEIRA, E.R.; INOUE, M.T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.26, n.7, p.949-953, 1991.

[REDACTED]

SZABADOS, L.; NÚÑUZ, V.M.; TELLO, L.M.; MAFLA, G.; ROA, J.; ROCA, W.M. Agentes gelatinizadores em el cultivo de tejidos. In: ROCA, W.H.; MROGINSKI, L.A., eds. Cultivo de tejidos em la agricultura - Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991.p.79-93

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Differentiation in *Lilium* bulb scales *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, n.48, p.121-125, 1980.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, v.30, n.19, p.1275-1283, 1979.

ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of pineapple. *HortScience*, v.16, p.495, 1981.

ZIV, M.; HALEVY, A.H. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. *HortScience*, v.18, n.4, p.434-436, 1983.



### **CAPÍTULO III**

## **IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS COMPONENTES DOS EXUDATOS PRESENTES NO MEIO DE CULTURA DEVIDO AO PROCESSO DE OXIDAÇÃO**

# **CAPÍTULO III. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS COMPONENTES DOS EXUDATOS PRESENTES NO MEIO DE CULTURA DEVIDO AO PROCESSO DE OXIDAÇÃO**

## **1 RESUMO**

Algumas plantas cultivadas *in vitro* liberam no meio de cultura substâncias denominadas metabólitos secundários, os quais em alguns casos, podem se apresentar em diferentes colorações e serem tóxicos aos explantes. Estes metabólitos podem ser de importância medicinal ou industrial, desde que identificados. Através de técnicas de cromatografia e infravermelho procurou-se realizar a identificação das substâncias encontradas nos meios de cultivo de estrelícia. Após diversos testes realizados com diferentes substâncias determinou-se como melhor solvente para extração o ácido acético. As amostras foram eluídas em colunas com sílica e então as frações obtidas foram levadas para identificação em infravermelho, encontrando-se nestas, a presença de grupos característicos de compostos fenólicos ou derivados.

## **2 ABSTRACT**

Some plants cultivated *in vitro* release in the culture medium substances known as secondary metabolites, which might present different colors and toxicity to the explants. When identified, these metabolites may be of industrial or medicinal importance. The objective of this work was to identify substances in the strelitzia culture medium through the use of chromatography and infrared techniques. After several tests with different substances, acetic acid was considered the best extraction solvent. Samples were eluted in silica columns and in the fractions. The presence of phenolic compounds and their derivatives were identified by infrared.

### 3 INTRODUÇÃO

As plantas superiores, em condições adequadas, produzem várias substâncias denominadas metabólitos secundários os quais, em sua maioria, são de natureza fenólica (Ibrahim, 1987).

Tecidos cultivados *in vitro* podem ser induzidos, em condições específicas e apropriadas, a produzir flavonóides como retrochalconas, licodione, derivados de flavonóides, isoflavonol, entre outros. A formação *in vitro* de antocianina tem ocorrido em culturas de espécies que naturalmente apresentam ou não cianidinas. A cianidina e seus glicosídeos são os pigmentos formados mais comumente, porém podem ocorrer derivados o-metilados, peonidinas, petunidinas, malvidinas, além de taninos condensados (protoantocianidinas e catecóis). Antraquinonas já foram identificadas em alguns gêneros (Ibrahim, 1987).

Segundo Ibrahim (1987), variações na composição dos meios de cultura podem influenciar a síntese de fenóis, sendo que estas variações podem ser quanto à composição e tipo de meio de cultura, fonte de carbono e reguladores de crescimento.

A produção de metabólitos secundários *in vitro* é de grande importância, pois substâncias de interesse podem ser extraídas e concentradas, além de auxiliar na determinação da composição química da planta de origem do explante. Assim, objetivou-se neste trabalho elaborar uma metodologia de extração de exudatos liberados no meio de cultura durante o cultivo de estrelícia, bem como identificá-los.

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

Através da utilização de técnicas cromatográficas, é possível fazer a separação de compostos químicos constituintes de uma substância através da distribuição entre uma fase estacionária e uma móvel (Harborne, 1984). Segundo este autor, a fase estacionária pode ser um sólido ou líquido sobre um sólido, nos quais flui a fase móvel. Na cromatografia, a distribuição das moléculas entre as fases, móvel e estacionária, pode ser devido à adsorção, troca iônica, partição ou filtração do gel. Estes processos atuam como retardantes, influenciando a migração dos componentes da mistura através da fase estacionária, movendo cada componente em diferentes proporções, separando a mistura em frações ou bandas de moléculas puras. As frações separadas podem ser quantificadas por um detector e/ou coletadas para uma análise posterior (Silverstein, Bassler e Morril, 1994).

Os métodos de cromatografia são classificados de acordo com suas fases móvel ou estacionária, sendo os mais comuns:

a. *Cromatografia Líquida (CL)* - separa íons metálicos e compostos orgânicos. A fase móvel é um líquido e a fase estacionária pode ser um líquido sobre um suporte sólido, um sólido ou uma resina de troca iônica. A cromatografia de adsorção é um método prático para se realizar a separação de substâncias e seu uso em colunas recheadas com o adsorvente sílica tem sido utilizado para separação de diversas substâncias de substratos variados (Silverstein, Bassler e Morril, 1994). A separação através de cromatografia líquida em coluna - CLC (gravidade ou adsorção) é feita por migração diferencial (Matos, 1988; Ferri, 1996).

b. *Cromatografia de Camada Delgada (CCD) ou Cromatografia de Camada Fina (TLC)* - Esta técnica é freqüentemente usada para separar compostos orgânicos. A fase estacionária consiste de uma fina camada sólida (~ 0,25 mm) que pode ser sílica gel ou pó de celulose, disposta em um suporte

plano, como uma placa de vidro (Ewing, 1972; Jeffery, 1989). Esta técnica assemelha-se à cromatografia de papel, exigindo apenas a preparação da placa. Pela cromatografia de camada delgada (CCD), a separação dos compostos é feita por migração diferencial, em função da polaridade (soluto x solvente). O processo de separação depende do solvente utilizado na fase móvel, podendo ser por adsorção, partição, troca iônica e/ou filtração de gel (Ewing, 1972; Jeffery, 1989). O revestimento da placa deve ser uniforme, para proporcionar separações limpas e reproduzíveis e para isto é essencial que as partículas apresentem tamanho uniforme. A amostra é colocada em uma margem ou extremidade da placa e a cromatografia é desenvolvida ascendentemente. Após a corrida, seca-se e pulveriza-se a placa com reagente. A CCD é mais rápida e geralmente mais aplicável que as outras técnicas cromatográficas líquidas sendo assim, largamente utilizada, principalmente para análises qualitativas (Ewing, 1972; Jeffery, 1989).

Após extração, a identificação e quantificação das substâncias ou dos componentes pode ser realizada, utilizando técnicas espectrométricas como por exemplo, infravermelho (IV), ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN<sup>1</sup>H), espectrometria de massa (EM) a cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Pela técnica de Infravermelho pode-se determinar os grupos funcionais da substância. Através da RMN<sup>1</sup>H, o deslocamento dos prótons e finalmente a EM nos fornece a fragmentação da molécula e o seu peso molecular (Ferri, 1996).

O espectro de infravermelho é característico de uma molécula, mas alguns grupamentos isolados podem formar bandas em frequências semelhantes. Baseando-se neste princípio, é possível identificar estruturas com compostos pela análise do espectro, associando-as a tabelas de padrões e outras informações estruturais (Silverstein, Bassler e Morrill, 1994). A espectroscopia de infravermelho não é uma técnica única, devendo ser utilizada em combinação com outras técnicas a fim de melhor determinar a estrutura dos compostos. Através da absorção da radiação na região do infravermelho (700 – 4.290 nm)

pela molécula, esta converte-se em energia de rotação molecular a qual é quantificada, sendo o espectro representado na forma de linhas ou bandas. O composto utilizado para análise deve ser puro e a interpretação dos resultados é feita através de comparações empíricas com outros espectros, pois cada tipo de ligação possui uma região de absorção específica (Silverstein, Bassler e Morrill, 1994).

## 5 METODOLOGIA

Os tubos, contendo material para análise química, oriundos de cultura de embriões de estrelicia foram selecionados em função das diferentes colorações que o processo oxidativo provocou no meio de cultura. Selecionaram-se tubos cujo meio de cultura apresentava as seguintes cores: preta (amostra A), marrom (amostra B), lilás (amostra C), azul (amostra D).

Após a seleção, realizou-se então um teste de solubilidade, aplicando os seguintes solventes puros: água, ácido acético, metanol, etanol, 2-propanol, butanol, 2-metil-propanol-1, pentanol, acetato de etila, piridina, acetona, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, tetracloreto de carbono, hexano, cicloexano, éter de petróleo, benzeno, tolueno, xileno. Dentre os solventes testados, o ácido acético apresentou os melhores resultados.

Retiradas as plantas dos tubos de ensaio, adicionou-se aos tubos ácido acético (20 mL) os quais foram mantidos por 24 horas para extração dos compostos. Após este período, procedeu-se à filtragem para separação do meio de cultura. As soluções contendo os compostos a serem analisados foram colocadas em estufa a 50 °C para evaporar o solvente.

Posteriormente, as amostras foram aplicadas em cromatoplaças utilizando tubos capilares de vidro. Transferiram-se estas placas para cubas cromatográficas, onde foram testados os seguintes sistemas de solventes: metanol / clorofórmio (1:1), metano / hexano (1:1), metanol / hexano (6:4),

metanol / hexano (4:6), metanol / hexano (8:2), metanol / hexano (2:8), metanol / éter de petróleo (1:1), hexano (1:0), clorofórmio (1:0), acetato de etila/metanol (1:1), acetato de etila / metanol (8:2), acetato de etila / metanol (2:8), acetato de etila / metanol (7:3), acetato de etila / metanol (3:7), acetato de etila / metanol (1:1), acetato de etila / metanol / hexano (4:3:3), metanol / tetracloreto de carbono (1:1), ácido acético / tetracloreto de carbono (1:1), hexano / metanol (7:3), ácido acético (1:0), hexano / metanol / ácido acético (1:1:1), hexano / metanol / clorofórmio (1:1:1), hexano / metanol / clorofórmio (1:8:1), hexano / metanol / clorofórmio (2:6:2), hexano / metanol / clorofórmio (1:1:8), hexano / metanol / clorofórmio (2:2:6), hexano / metanol / clorofórmio (8:1:1), hexano / metanol / clorofórmio (6:2:2), ácido acético / clorofórmio / hexano (8:1:1), ácido acético / clorofórmio / hexano (6:2:2), ácido acético / clorofórmio / hexano (1:1:8), ácido acético / clorofórmio / hexano (2:2:6), ácido acético / clorofórmio / hexano (0,5:1,5:8), ácido acético / clorofórmio / hexano (0,5:8:1,5), clorofórmio / metanol / acetona (1:1:1), clorofórmio / etanol / acetona (1:1:1), clorofórmio / metanol / acetona (1:8:1), clorofórmio / metanol / acetona (2:6:2), clorofórmio / metanol / acetona (0,5:9:0,5), clorofórmio / metanol / acetona (1,5:7:1,5), clorofórmio / metanol / acetona (2:7:1), clorofórmio / metanol / acetona (1:7:2), metanol (1:0), clorofórmio / metanol (3:7), clorofórmio / metanol (1:9), clorofórmio / metanol (95:0,5), tetracloreto de carbono (1:0), hexano / clorofórmio (1:1), hexano / clorofórmio (1:1), hexano / metanol (9:1), hexano / metanol (1:1), clorofórmio / acetona (1:1), clorofórmio / acetona (3:7), clorofórmio / acetona (7:3), clorofórmio / acetona (6:4), metanol / acetona (1:1), metanol / acetona (4,5:4,5:1), metanol / acetona (6:4) e metanol / acetona (4:6).

Após a fase móvel ter atingido a parte superior das cromatoplas (10,0 cm), estas foram retiradas da cuba, secas ao ar e levadas para revelação em um recipiente fechado contendo iodo. Para a determinação do R<sub>f</sub> (Razão de fluxo), segundo a fórmula sugerida por Mabry, Markhan e Thomas (1970):  $R_f = \text{(Distância percorrida pela amostra)} / \text{(Distância percorrida pelo eluente)}$ , marcou-se a distância percorrida pela fase móvel e pela mancha nas cromatoplas.

Determinados os melhores solventes para separação, procedeu-se ao preparo da coluna para realização da cromatografia líquida em coluna (CLC). Utilizou-se coluna de 55 cm x 2,0 cm de diâmetro, preenchida em 25 cm de altura com sílica gel 60 (70–230 mesh) diluída em clorofórmio. A quantidade de sílica foi calculada baseando-se na fórmula  $V = \pi \cdot r^2 \cdot h \cdot 0,36$ , onde V = peso da sílica, r = raio da coluna, h = altura do enchimento desejado da coluna. As amostras utilizadas na coluna foram preparadas de modo idêntico às utilizadas para confecção das cromatoplas. O extrato concentrado foi diluído em ácido acético para aplicação na coluna. Para cada amostra obtida do meio de cultura realizou-se uma CLC, com os diferentes eluentes, na seqüência:

Amostra A: metanol, ácido acético, hexano

Amostra B: hexano, clorofórmio, metanol, metanol / ácido acético (9:1), ácido acético / água / metanol (10:2:88), ácido acético / água / metanol (10:5:85) e água.

Amostra C: clorofórmio, acetona, metanol, metanol / ácido acético (70:10), ácido acético, ácido acético / água (60:20) e água.

Amostra D: clorofórmio, acetona, metanol, metanol / ácido acético (7:1) e ácido acético.

As frações foram coletadas a uma vazão de 1 mL por minuto e mantidas em estufa a 50 °C para evaporar o solvente. Para determinação dos grupos funcionais dos compostos, realizou-se então a análise de Infravermelho no Departamento de Química da UFLA.



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do teste de solubilidade, observou-se que as amostras apresentavam-se solúveis nos seguintes solventes (Tabela 1):

TABELA 1. Relação de solventes nos quais as amostras constituídas de exudatos do meio de cultivo de estrelicia se apresentaram solúveis. UFLA, Lavras/MG, 1997.

<i>AMOSTRA</i>	<i>SOLVENTE</i>
A (preto)	<i>Ácido acético, piridina</i>
B (marrom)	<i>Ácido acético, piridina</i>
C (lilás)	<i>Ácido acético, éter de petróleo</i>
D (azul)	<i>Ácido acético, piridina, éter de petróleo</i>

Em função de apresentar maior solubilidade utilizou-se o ácido acético como solvente para extração das amostras do substrato.

Nas cromatografias em camada delgada, objetivando identificar a melhor combinação de solventes para separação dos componentes das amostras, manchas em maior definição foram observadas com os solventes designados na Tabela 2. Observou-se nas placas a ocorrência de uma mancha única. Esta tabela apresenta ainda os respectivos valores de R<sub>f</sub> observados para cada amostra.

TABELA 2. Combinação de solventes que proporcionaram melhor definição de manchas nas cromatoplasas com os respectivos valores de Rf para as amostras de estrelicia extraídas de exudatos do meio de cultura. UFLA, Lavras/MG, 1997.

<i>AMOSTRA</i>	<i>SOLVENTES</i>	<i>Rf</i>
A (preto)	Metanol / clorofórmio (9:1)	0,66
B (marrom)	Hexano / clorofórmio / metanol (1:1:1)	0,71
C (lilás)	Clorofórmio / acetona / metanol (70:15:15)	0,79
D (azul)	Clorofórmio / acetona / metanol (70:15:15)	0,72

Após a análise de infravermelho, identificaram-se os valores para as amostras que demonstraram boa definição, conforme descrito na Tabela 3.

TABELA 3. Valores de Infravermelho observados em amostras extraídas de exudatos do meio de cultura de estrelicia. Lavras/MG, UFLA, 1997.

<i>AMOSTRA</i>	$V_{KBr}(cm^{-1})$
A (preto)	-
B (marrom)	3500-3000, 2900-2800, 1564, 1261, 1097-1028, 864
C (lilás)	3000-2800, 1750, 1500
D (azul)	-

As amostras A e D não apresentaram espectro nítido de forma que pudessem ser feitas identificações. Mas pela sobreposição de algumas bandas pode-se inferir que as colorações marrom e lilás representam diluições ou ocorrência em menor intensidade das colorações preta e azul, respectivamente, ou seja, representam a mesma substância. Pelos espectros, entretanto, pode-se confirmar que as amostras B e C correspondem a substâncias diferentes. A

ausência de bandas nítidas ou bons espectros nas amostras A e D pode ser atribuída à produção de outros metabólitos ou ausência do material.

Através dos espectros de infravermelho da amostra B (Figura 1), pode-se perceber que a substância em estudo refere-se a uma molécula apresentando em sua estrutura um grupamento OH, o qual aparece em um intervalo de 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$ . Entre 2800-2900  $\text{cm}^{-1}$ , observam-se bandas que podem ser atribuídas a grupos metilênicos ( $-\text{CH}_2$ ) e metínicos ( $-\text{CH}$ ) sobrepostos. Uma banda característica de insaturações conjugadas aparece nitidamente a 1564  $\text{cm}^{-1}$ . A presença de ligação C-O ocorre no intervalo de 1028-1097  $\text{cm}^{-1}$ , o que confirma a ocorrência de deformação da ligação. Próximo de 800  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda fina que pode ser atribuída à deformação angular fora do plano da ligação C-C do anel aromático para substituído.

Comparando-se estes dados com a literatura, sugere-se que o produto isolado pode ser caracterizado como um fenol ou seu derivado. Watson e Dallwitz (1996), descrevendo plantas de estrelicia, identificaram a presença de cianidina e flavonóides. Na análise das amostras não se observaram bandas que indicassem a presença de cianidina, apenas de compostos fenólicos. Apesar dos resultados serem promissores, há necessidade de outras análises como  $\text{RMN}^1\text{H}$ ,  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ , EM e UV para confirmação de sua composição e estrutura.

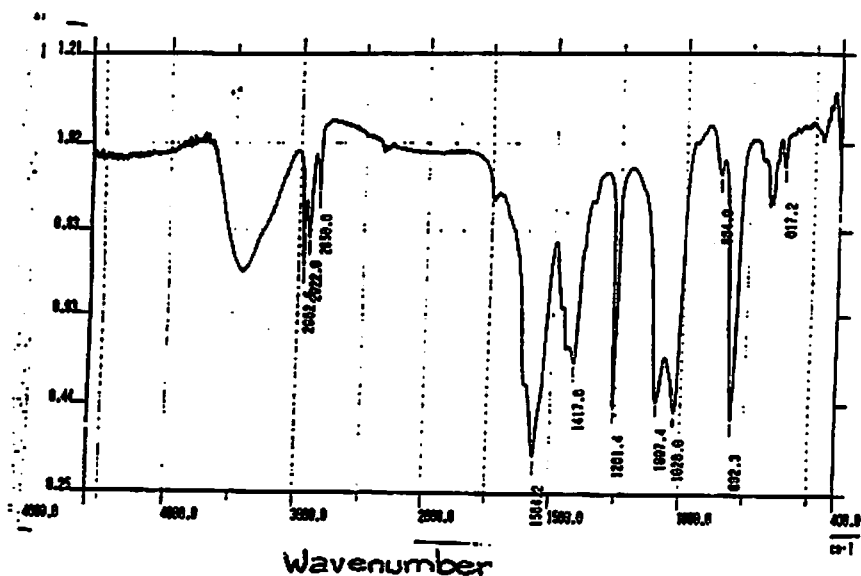


FIGURA 1. Espectro de Infravermelho do composto da amostra B. UFLA, Lavras/MG, 1997.

O espectro da amostra C (Figura 2), cuja fração foi isolada em clorofórmio, apresenta uma banda fina situada entre 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ , característica de grupos metilas ( $-\text{CH}_3$ ) e metilênicos ( $-\text{CH}_2$ ) sobrepostos. Apresenta também uma banda forte em torno de 1750  $\text{cm}^{-1}$ , a qual é atribuída ao grupo carbonila livre presente na molécula e uma absorção em torno de 1500  $\text{cm}^{-1}$ . A presença de carbonila no composto C e não no composto B, sugere que

estão presentes metabólitos secundários, formados provavelmente em função de variações ambientais, idade da planta, degradação de moléculas, etc.

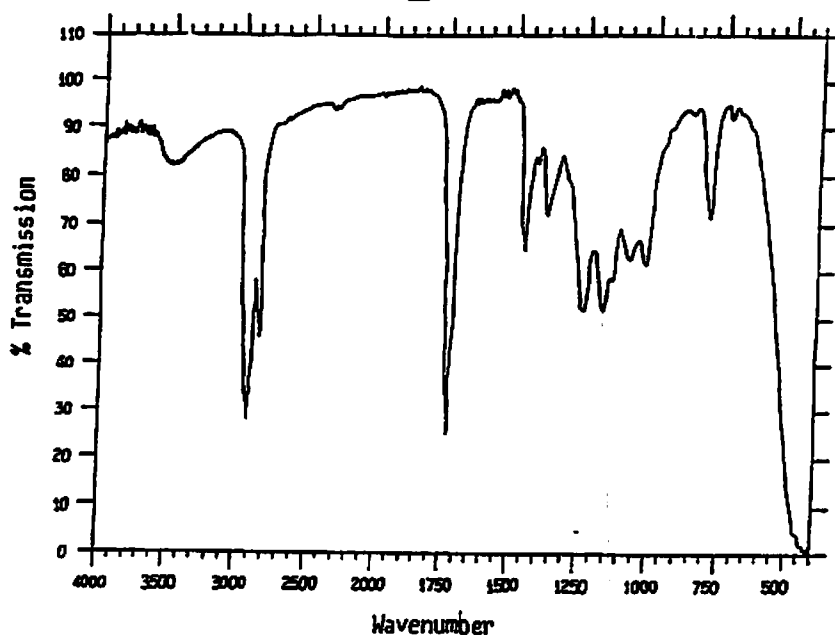


FIGURA 2. Espectro de infravermelho do composto C. UFLA, Lavras/MG, 1997.

As amostras A e D não apresentaram espectro nítido que pudessem ser feitas identificações. Mas, pela sobreposição de algumas bandas, pode-se inferir que as colorações marrom e lilás representam diluições ou ocorrência em menor intensidade das colorações preta e azul, respectivamente, ou seja, representam a mesma substância. Pelos espectros, entretanto, pode-se confirmar que as amostras B e C correspondem a substâncias diferentes. A ausência de bandas nítidas ou bons espectros pode ser atribuída à produção de outros metabólitos ou na ausência do material na amostra.

## **7 CONCLUSÕES**

- Compostos fenólicos ou seus derivados estão presentes nos pigmentos de coloração marrom identificados em meios de cultura oxidados de estrelicia.
- Compostos com grupamentos cianídricos não foram observados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EWING, G.W. **Métodos instrumentais de análise química**, v.2. São Paulo: Editora Edgard Blucher (USP), 1972. 514p. (trad.).
- FERRI, PH **Química de produtos naturais-métodos gerais**. In: DI STASSI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996, p.129-156.
- HARBORNE, J.B. **Methods of plant analysis**. In: HARBORNE, F.B. (ed.) **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. Hong Kong: Chapman and Hall, 1984. p 1-36.
- IBRAHIM, R.K. **Regulation of synthesis of phenolics**. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, v.4 – Cell culture in phytochemistry. San Diego: Academic Press, Inc., 1987. p.77-95.
- JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNY, R.C. **Análise química quantitativa**, 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 712p. (Trad.).
- MATOS, F.J.A **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988. 126 p.
- MARBRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The two-dimensional paper chromatographic analysis of flavonoids**. In: MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. (eds.) **The systematic identification of flavonoides**. Berlin: Springer-Verlag, 1970, p.3-15.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1994, 387p. (Trad.).
- WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. **The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, identification and information retrieval**. Version November 25, 1996. URL <http://www.keil.ukans.edu/delta/>.



... ..  
... ..  
... ..  
... ..

**ANEXOS**

## SUMÁRIO

ANEXO 1. Conteúdo dos meios de cultura MS, B5 e Knudson.....	85
ANEXO 2. Composição do meio de cultura desenvolvido por ZIV e HALEVY (1983) para cultivo de estrelícia.....	86

**ANEXO 1. Conteúdo dos meios de cultura MS, B5 e Knudson.**

<i>Componentes</i>	<i>Meios de Cultura</i>		
	MS	B5	Knudson
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg/L		
KNO <sub>3</sub>	1900 mg/L	2500 mg/L	
NH <sub>4</sub> Cl			500
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440 mg/L	150 mg/L	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370 mg/L	250 mg/L	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/L		1000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O		150 mg/L	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub>		134 mg/L	2000
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3 mg/L		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O		10 mg/L	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/L	2000 mg/L	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/L	3 mg/L	
KI	0,83 mg/L	0,75 mg/L	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/L	0,25 mg/L	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,24 mg/L	0,025 mg/L	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L	0,025 mg/L	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8 mg/L	27,8 mg/L	
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3 mg/L	37,2 mg/L	
Glicina	2,0 mg/L		
Acido nicotínico	0,5 mg/L	1 mg/L	
Piridoxina.HCl	0,5 mg/L	1,0 mg/L	
Tiamina.HCl	0,1 mg/L	10,0 mg/L	
Mio-inositol	100 mg/L	100 mg/L	

**ANEXO 2. Composição do meio de cultura desenvolvido por ZIV e  
HALEVY (1983) para cultivo de estrelícia.**

**Meio MS 50%**

2,5 mg/l IBA

1,0 mg/L ANA

5,0 mg/L cinetina

0,5 mg/L 2,4-D

1% de carvão ativado

52 mg/L de cloranfenicol

25 mg/L de oxitetraciclina