



JÚNIA RAFAEL MENDONÇA FIGUEIREDO

**CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE
ESTRELÍCIA**

**LAVRAS-MG
2018**

JÚNIA RAFAEL MENDONÇA FIGUEIREDO

CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE ESTRELÍCIA

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva
Orientadora

Prof. Renato Paiva, Ph.D.
Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery
Coorientadores

**LAVRAS-MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Figueiredo, Júnia Rafael Mendonça.

Cultivo *in vitro* e criopreservação de estrelícia / Júnia Rafael Mendonça Figueiredo. - 2018.

87 p.: il.

Orientador(a): Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Coorientador(a): Renato Paiva, Fernanda Carlota Nery.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Cultivo de embriões zigóticos. 2. Multiplicação e aclimatização. 3. Criopreservação. I. Paiva, Patrícia Duarte de Oliveira. II. Paiva, Renato. III. Nery, Fernanda Carlota. IV. Título.

JÚNIA RAFAEL MENDONÇA FIGUEIREDO

CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE ESTRELÍCIA
***IN VITRO* CULTURE AND CRYOPRESERVATION OF STRELITZIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 15 de março de 2018

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho	EMBRAPA
Dra. Stella Dellyzete Veiga Franco da Rosa	EMBRAPA
Profa. Dra. Vanessa Cristina Stein	UFSJ
Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva	UFLA

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva
Orientadora

Prof. Renato Paiva, Ph.D.
Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery

Coorientadores

LAVRAS-MG
2018

Aos meus pais e aos meus irmãos,

OFEREÇO

*Ao Duzinho, pelo incentivo e presença nas
alegrias das minhas conquistas,*

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Antônio Eugênio e Mariélen, por acreditarem junto comigo nos meus sonhos. Aos meus irmãos, Thales, pelo amor e por ser meu exemplo de determinação e Cássio, pelo carinho. Ao Duzinho por estar ao meu lado em todos os momentos, me apoiando em todas as decisões.

À Universidade Federal de Lavras e ao Setor de Fisiologia Vegetal pela possibilidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, pela atenção, incentivo e ensinamentos.

Ao professor Renato Paiva por disponibilizar o laboratório para a realização dos trabalhos.

Ao Diogo, Michele, Camila, Raquel e Rafa por toda ajuda durante a realização dos experimentos e correção da tese.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos, do Núcleo de Estudos de Paisagismo e Floricultura (NEPAFLOR) e Núcleo de Estudos em Fisiologia Vegetal (NEF), por toda troca de experiência e por todos os trabalhos realizados juntos.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Lavras, principalmente do Setor de Fisiologia Vegetal, que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Barrinha pela disponibilidade durante a coleta das sementes.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições. E a todos que, de alguma maneira contribuíram para a conclusão dessa etapa, deixo meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

JÚNIA RAFAEL MENDONÇA FIGUEIREDO, filha de Antônio Eugênio Botrel Corrêa Figueiredo e de Mariélen Rafael de Mendonça Figueiredo, nasceu no dia 07 de junho de 1991, na cidade de Três Pontas, estado de Minas Gerais, Brasil. Ingressou nos cursos de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ) em 2010, concluindo os mesmos em 2014, quando apresentou as monografias de conclusão de curso “A inclusão social e a estrutura escolar para atender alunos com necessidades educacionais especiais em uma escola de São João del Rei- MG” e “Desenvolvimento do copo-de-leite em função da adubação com biofertilizante” com auxílio financeiro de bolsa de iniciação à docência da CAPES e de bolsa de iniciação científica da Fapemig, respectivamente. Em setembro de 2015 concluiu o mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal com a dissertação “Estresse salino no desenvolvimento de copo-de-leite” com auxílio financeiro da Fapemig, sendo parte desse trabalho apresentado no congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal, realizado no ano de 2015 na Espanha. Em outubro de 2015 iniciou o doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal e durante o primeiro ano participou como membro Núcleo de Estudos em Paisagismo e Floricultura (NEPAFLOR) e posteriormente assumiu cargo de coordenação no Núcleo de Estudos em Fisiologia Vegetal (NEF). De abril de 2016 a janeiro de 2017 participou do programa de docência voluntária da Universidade Federal de Lavras, ministrando a disciplina de Fisiologia Vegetal para o curso de Engenharia Florestal. Atualmente, é professora no curso de Agronomia da Universidade do Vale do Rio Verde (UninCor), em Três Corações, Minas Gerais.

“Qualquer trabalho que não exija superação, que não desafie os seus limites, que não cause vontade de desistir em alguns momentos e que seja agradável todo o tempo não proporcionará crescimento.”

Livro Geração de Valor

RESUMO

A estrelícia (*Strelitzia reginae*) é uma planta ornamental muito utilizada como flor de corte e em jardins. No entanto, a propagação convencional da espécie é limitada pela dormência química e física das sementes e pelo pequeno número de brotos formados a partir da divisão de rizomas, assim, a propagação *in vitro* é uma alternativa para a reprodução dessa espécie. Entretanto, mudas produzidas *in vitro* podem apresentar limitações durante a aclimatização, havendo necessidade de desenvolver uma metodologia para otimizar essa etapa. Além disso, o comércio de flores é marcado por tendências, sendo necessário o desenvolvimento de técnicas para a conservação do germoplasma. Dentre as técnicas que podem ser utilizadas, a criopreservação se destaca por permitir a conservação em longo prazo, no entanto, conhecimento sobre os efeitos na estabilidade genética e aspectos anatômicos das plantas são importantes. Dessa forma, objetivou-se avaliar como o GA₃ e a temperatura afetam a germinação de embriões zigóticos e o desenvolvimento *in vitro* das plântulas, bem como, o efeito de BAP e TDZ na multiplicação, a utilização de telas fotoconversoras durante a aclimatização e o efeito da criopreservação no desenvolvimento, anatomia e estabilidade genética das plantas de estrelícia. Maior germinação (72%) e comprimento da parte aérea (3,14 cm) foram observados com a utilização de 20 µM de GA₃. Nessa concentração houve aumento da atividade da redutase do nitrato, sem alteração da estabilidade genética. A temperatura influenciou no crescimento das plantas, o qual foi maior em 25°C e também na atividade da SOD e APX, que foram mais elevadas com 30°C. Os resultados demonstraram que 20 µM de BAP proporcionou maior formação de brotações, porém, estes apresentaram redução do comprimento, além de incremento da oxidação do meio de cultura, enquanto que o TDZ não induziu a formação de brotações, nem mesmo redução do comprimento e oxidação do meio de cultura. Durante a aclimatização, a maior taxa de sobrevivência ocorreu para as plantas mantidas na ausência de telas fotoconversoras e para a criopreservação, a desidratação em sílica-gel por 30 minutos foi eficiente para o melhor desenvolvimento das plântulas, não ocorrendo alterações anatômicas e mudanças na estabilidade genética. Dessa forma, recomenda-se para o cultivo *in vitro* o acréscimo de 20 µM de GA₃ ao meio de cultura e a manutenção na temperatura de 25°C para melhor germinação dos embriões zigóticos e desenvolvimento das plântulas, a utilização de 20 µM de BAP para a multiplicação, a

ausência de telas fotoconversoras para aclimatização, bem como, a desidratação dos embriões zigóticos por 30 minutos em sílica-gel para a criopreservação.

Palavras-chave: *Strelitzia reginae*. Giberelina. Citocinina. Aclimatização. Criopreservação.

ABSTRACT

Strelitzia (*Strelitzia reginae*) is an ornamental plant used as a cut flower and in landscaping. However, specie propagation is limited by the chemical and physical dormancy of the seeds and by the number of shoots formed, thus, *in vitro* propagation is an alternative for the reproduction of this species. However, *in vitro* produced seedlings may present limitations during acclimatization, it is necessary to develop a methodology to optimize these step. In addition, the flower trade is marked by trends, requiring the development of techniques for the conservation of germplasm. Among the techniques that can be used, cryopreservation can be used for the long-term conservation of the species, being necessary to know about the effects on the genetic stability and anatomical aspects of the plants. The objective was to evaluate how GA₃ and temperature affect the *in vitro* development of zygotic embryos, as well as the effect of BAP and TDZ on multiplication, the use of coloured shade nets during acclimatization and the effect of cryopreservation in the development, anatomy and genetic stability of *strelitzia*. Greater germination (72%) and shoot length (3.14 cm) were observed with the use of 20 µM of GA₃. In this concentration there was an increase in nitrate reductase activity, without altering the genetic stability. The temperature influenced plant growth, which was higher at 25°C and also in the SOD and APX activity, which were higher at 30°C. The results showed that 20 µM BAP provided a higher shoot formation, however, these showed a reduction in length, as well as increased oxidation of the medium since TDZ did not induce shoots. During acclimatization, the highest survival rate occurred for plants maintained without coloured shade nets and during cryopreservation, silica gel dehydration for 30 minutes was efficient for better seedling development, with no anatomical changes and changes in genetic stability. So, it is recommended for the cultivation of zygotic embryos, the addition of 20 µM of GA₃ and maintenance at the temperature of 25°C, and for the multiplication 20 µM of BAP is efficient and acclimatization must be performed in the absence of coloured shade nets and for cryopreservation, dehydration should be performed for 30 minutes on silica gel.

Keywords: *Strelitzia reginae*. Gibberellin. Cytokinin. Acclimatization. Cryopreservation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Floricultura.....	15
2.1.1 Estrelícia.....	15
2.2 Cultura de tecidos.....	17
2.2.4 Aclimatização.....	20
2.2.3 Criopreservação.....	22
REFERÊNCIAS	24
Artigo 1: Aplicação exógena de GA₃ e temperatura no desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de estrelícia.....	30
1 INTRODUÇÃO	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Material Vegetal.....	35
2.2 Efeito do GA ₃ na germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento de plântulas de estrelícia.....	35
2.2.1 Atividade da redutase do nitrato.....	36

2.2.2 Estabilidade genética.....	36
2.3 Efeito da temperatura na regeneração de embriões zigóticos e desenvolvimento de plântulas.....	37
2.3.1 Influência da temperatura no metabolismo antioxidante.....	37
2.4 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Efeito do GA ₃ na germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento de plântulas de estrelícia.....	39
3.1.1 Efeito do GA ₃ na atividade da redutase do nitrato.....	40
3.1.2 Efeito do GA ₃ na estabilidade genética das plântulas.....	42
3.2 Influência da temperatura na regeneração de embriões zigóticos, desenvolvimento de plântulas e metabolismo antioxidante.....	43
4 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS	47
Artigo 2: Otimização do processo de multiplicação <i>in vitro</i> e aclimatização de estrelícia	51
1 INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Material Vegetal.....	55
2.2 Efeito do BAP e TDZ na multiplicação de plantas de estrelícia.....	56
2.3 Efeito de telas fotoconversoras na aclimatização de plantas de estrelícia.....	57
2.4 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 Efeito do BAP e TDZ na multiplicação de plantas de estrelícia.....	58

3.2 Efeito de telas fotoconversoras na aclimatização de plantas de estrelícia.....	61
4 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	64
Artigo 3: Alterações anatômicas e estabilidade genética em plantas de estrelícia após criopreservação de embriões	67
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1 Material Vegetal.....	71
2.2 Criopreservação dos embriões zigóticos.....	72
2.3 Aclimatização.....	73
2.3.1 Avaliações anatômicas.....	73
2.3.2 Estabilidade genética - análises de citometria de fluxo.....	74
2.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	74
3 RESULTADOS	75
3.1 Criopreservação de embriões zigóticos de estrelícia.....	75
3.2 Aclimatização.....	76
3.2.1 Avaliações anatômicas.....	78
3.2.2 Estabilidade genética.....	81
4 DISCUSSÃO	82
5 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as espécies ornamentais, *Strelitzia reginae* Banks ex Aiton, conhecida popularmente como estrelícia, se destaca pelo elevado potencial econômico, sendo altamente utilizada como flor de corte e em jardins, devido às características exóticas de suas flores que emergem das brácteas e comprimento da haste. Porém, a exploração comercial da espécie se torna limitada pela baixa taxa de propagação por métodos convencionais, devido pequeno número de mudas formadas a partir da divisão de rizomas e dormência química e física das sementes (PAIVA et al., 2004; PATEL et al., 2017). Assim, a propagação *in vitro* pode ser uma alternativa, sendo que o cultivo de embriões zigóticos é uma forma viável, principalmente por permitir a superação da dormência física das sementes apresentada por essa espécie (PAIVA et al., 2004; PECH Y AKÉ et al., 2007). Contudo, o processo de germinação de embriões zigóticos é uma etapa crítica, e a composição do meio de cultura com reguladores de crescimento vegetal, bem como, o controle da temperatura, podem ser importantes para o melhor estabelecimento e desenvolvimento das plântulas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Após obter sucesso no estabelecimento *in vitro*, as técnicas de multiplicação podem ser utilizadas possibilitando produção de mudas na ausência de patógenos e com as características desejadas (KELLER et al., 2013). No entanto, ainda não há um protocolo eficiente para propagação *in vitro* de estrelícia, consequência da ocorrência de oxidação (NORTH et al., 2012) e baixa taxa de multiplicação, sendo registrada a formação de apenas 1,0 broto por explante quando cultivados meristemas, embriões zigóticos imaturos, segmentos foliares e gemas axilares (NORTH et al., 2011; PAIVA et al., 2004; ZIV; HALEVY, 1983), havendo a necessidade de otimizar o processo.

Além disso, durante o cultivo *in vitro*, as condições controladas do meio de cultura, temperatura, luminosidade e umidade relativa que as plantas são submetidas podem causar alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas, limitando a adaptabilidade dessas plantas durante o processo de transferência para o ambiente *ex vitro* (XIAO; NIU; KOZAI, 2011). Dentre essas condições ambientais citadas, a baixa densidade de fluxo de fótons pode

influenciar devido comprometimento do desenvolvimento da maquinaria fotossintética. Por isso, o controle da intensidade da radiação na etapa de aclimatização pode contribuir para aumentar a taxa de sobrevivência, evitando que danos fotooxidativos sejam causados, devido maior intensidade da luminosidade (OSÓRIO; OSÓRIO; ROMANO, 2010).

Contudo, mesmo obtendo sucesso para um protocolo de cultivo *in vitro* da espécie, um protocolo para a conservação em longo prazo do material pode ser necessário, uma vez que, o mercado de flores e plantas ornamentais é marcado por tendências, havendo necessidade de conservar a diversidade de espécies e cultivares. Todavia, quando a conservação é realizada por produtores e melhoristas se torna dispendiosa e acarreta em riscos por ocorrência de estresses bióticos e abióticos. Uma forma alternativa seria a conservação *in vitro*, no entanto, também pode ocorrer perda do material devido contaminação, erro humano e variação somaclonal. Assim, a criopreservação surge como uma alternativa viável (PANIS; LAMBARDI, 2006; SEKIZAWA et al., 2011).

A criopreservação se destaca por permitir o armazenamento em longo prazo do material, sendo a criopreservação de embriões zigóticos importante para espécies que apresentam dificuldades de germinação (PRITCHARD; BEEBY; DAVIES, 1998; PRUDENTE et al., 2016), como o caso da estrelícia. Entretanto, atualmente, não existem relatos na literatura para criopreservação dessa espécie. Assim, objetivou-se desenvolver um protocolo para o cultivo *in vitro* de estrelícia, bem como, realizar a criopreservação de embriões zigóticos dessa espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Floricultura

A floricultura se caracteriza pela produção de flores e plantas ornamentais, apresentando crescimento acelerado em todo o mundo. Atualmente, esse segmento agrícola tem potencial para ser o mais rentável dentro da horticultura (DESAI; INGHALIHALLI; KRISHNAMURTHY et al., 2015). No Brasil, o número de produtores, áreas cultivadas e o valor bruto da produção, são indicadores importantes do crescimento desse setor (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014). Dessa forma, em escala mundial, o Brasil tem se destacado e está entre os 15 maiores países produtores, apresentando potencial para avançar no ranking, especialmente em relação à produção de espécies tropicais (IBRAFLOR, 2017; QUEIROZ; SILVA; MARTINS, 2016).

A produção de plantas tropicais vem se destacando dentro do segmento hortícola brasileiro, uma vez que, as flores exóticas, com diversidade de cores e formas, resistência ao transporte, durabilidade pós-colheita e boa aceitação no mercado externo são elementos favoráveis para a comercialização (DIAS, 2016).

Dentre as regiões produtoras de plantas tropicais, podemos citar os estados de Alagoas e Pernambuco, o que contribui para a geração de renda aos pequenos produtores, promovendo o desenvolvimento dessas regiões. Além desses estados, Minas Gerais se destaca na produção de plantas tropicais (LANDGRAF; PAIVA, 2009). Dentre as espécies mais cultivadas comercialmente estão antúrio, estrelícia, helicônias, alpínia, gengibre-ornamental e bastão-do-imperador (LIMA; FERRAZ, 2008).

2.1.1 Estrelícia

Dentre as plantas tropicais, as espécies do gênero *Strelitzia* (*S. reginae*, *S. alba*, *S. jucea*, *S. caudata*) apresentam destaque pela beleza, formato e comprimento da haste. Essas plantas são monocotiledôneas pertencentes à ordem Zingiberales e a família Strelitziaceae,

sendo que dentre as espécies do gênero, a mais cultivada é *Strelitzia reginae* Banks ex Aiton, conhecida popularmente como ave-do-paraíso ou estrelícia. É uma planta rizomatosa, entouceirada com folhas firmes e coriáceas (LORENZI; SOUZA, 2001). É originária da África do Sul, mas em 1770 foi introduzida na Europa de onde foi disseminada para todo o mundo, devido às características exóticas de suas flores que emergem das brácteas, tornando-se uma cultura muito comercializada, sendo utilizada tanto em jardins como flor de corte (PATEL et al., 2017).

Essa espécie se desenvolve em ambientes tropicais e subtropicais e apresenta grande potencial para ser produzida mundialmente. A propagação convencional da espécie é realizada por sementes ou pela divisão de touceiras (NORTH et al., 2012; PAIVA et al., 2004). Todavia, as sementes apresentam dormência química causada pela presença de um inibidor da germinação e dormência física, consequência da impermeabilidade do tegumento e rigidez do endosperma, o que influencia na germinação e desenvolvimento das plantas, as quais necessitam de certa de 4 à 7 anos para iniciar a floração (PAIVA; ALMEIDA, 2012; VAN DE VENTER, 1978). Por esses motivos, trabalhos com escarificação mecânica, lixiviação em água, aumento da concentração de O₂, reguladores de crescimento, ácido sulfúrico, embebição em água e diferentes temperaturas já foram realizados para otimizar a germinação, no entanto, novos trabalhos são necessários (BARBOSA et al., 2005; BESEMER, 1976; DIAZ, 1978; ISHIHATA, 1976; VAN DE VENTER, 1978; VAN DE VENTER; SMALL, 1975). Adicionalmente, a divisão de touceiras proporciona pequeno número de mudas, o que limita a reprodução e produção da espécie (PAIVA; ALMEIDA, 2012).

Além disso, a comercialização é limitada devido à presença de doenças fungícas, as quais causam podridão na base do caule, resultando em desprendimento do caule e da raiz, ocorrendo também podridão e murchamento das folhagens (AIELLO et al., 2017). Assim, o desenvolvimento de um protocolo de propagação *in vitro* poderia contribuir para a seleção de clones melhorados e para proliferação em massa de estrelícia (PAIVA et al., 2004; ZIV; HALEVY, 1983).

2.2 Cultura de tecidos

A propagação *in vitro* ou micropropagação tem sido utilizada visando à produção de plantas em larga escala com qualidade superior. Com essa técnica, é possível realizar o cultivo de células, tecidos, órgãos, embriões zigóticos e plantas inteiras em condições ambientais e nutricionais controladas (SMITH, 2013).

Atualmente, o cultivo de embriões zigóticos tem sido empregado para reduzir o tempo de germinação, para produção de mudas com alta qualidade, livre de patógenos e com homogeneidade de desenvolvimento, pois a retirada do endocarpo e endosperma pode facilitar a nutrição do embrião. Além disso, o cultivo de embriões zigóticos, é importante para subsidiar programas de melhoramento genético e conservação de espécies (PÁDUA et al., 2014). Todavia, a germinação e a formação de plântulas são processos complexos que envolvem fatores fisiológicos e condições ambientais (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Entre os fatores fisiológicos, o balanceamento hormonal apresenta grande importância para o desenvolvimento dos embriões zigóticos. Auxinas, giberelinas e citocininas estão entre os hormônios e reguladores de crescimento vegetal que influenciam fortemente no crescimento e na morfogênese das culturas de embriões zigóticos (RAGHAVAN, 2003; ROCHA, MONTE-BELLO, DORNELAS, 2015).

Dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA_3) se destaca por apresentar função na quebra de dormência de sementes e embriões (SINGH et al., 2016). Na presença desse regulador foi possível perceber, melhor germinação de embriões zigóticos para *Cocos nucifera* e *Syagrus coronata*, os quais apresentaram aumento de 33% e 30%, respectivamente (MEDEIROS et al., 2015; MONTERO-CORTÉS et al., 2011)

De forma adicional, o GA_3 influencia no metabolismo das plantas, uma vez que, pode estar relacionado com o aumento da atividade de enzimas hidrolíticas e enzimas importantes do metabolismo, como redutase do nitrato, o que foi observado para *Trigonella foenum-graecum* L e para *Artemisia annua* L, que apresentaram aumento de 30,8% e 25,9%, respectivamente (AHMAD DAR et al., 2015; AFTAB et al., 2010). O aumento da atividade da redutase do nitrato pode ser benéfico, visto que, essa enzima é responsável pela redução de

nitrito em nitrato, sendo então a primeira reação para a assimilação de nitrogênio na forma de nitrato nas plantas. O nitrogênio é um elemento essencial encontrado em muitas macromoléculas e componentes do metabolismo secundário, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, componentes da parede celular, hormônios e vitaminas (KRAPP, 2015).

No entanto, é importante ter controle das concentrações utilizadas do regulador de crescimento, pois o desbalanceamento hormonal pode causar variações na estabilidade genética das plantas (SAMARFARD et al., 2014). Essas alterações na estabilidade genética podem ser constatadas por meio de análise de citometria de fluxo, que permite conhecer o conteúdo de DNA e estimar o nível de ploidia (DOLEZEL, 1997).

Por outro lado, quando avaliada as condições ambientais, a temperatura está entre os fatores mais importantes na regulação da germinação, crescimento e desenvolvimento das plantas, visto que, influencia na absorção de água, reações bioquímicas e em processos fisiológicos (AKRAMGHADERI; SOLTANI; SADEGHIPOUR, 2008; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Cada espécie apresenta uma temperatura ótima para a germinação e crescimento, assim, variações extremas podem causar danos severos nas plantas, ocasionando mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (SOUTO et al., 2017). Por esse motivo, é importante identificar não só a temperatura ótima, mas também o limite máximo e mínimo tolerado para cada espécie, pois esse estudo auxilia no sucesso da germinação e estabelecimento das plantas, bem como, na construção de modelos que permitem o progresso das culturas (AKRAMGHADERI; SOLTANI; SADEGHIPOUR, 2008).

A menor taxa de germinação e desenvolvimento das plantas em temperaturas abaixo da ótima, provavelmente ocorre devido redução no metabolismo. Por outro lado, os efeitos negativos das temperaturas mais elevadas estão relacionados com as alterações na fluidez da membrana. Dessa forma, o estresse térmico pode desacoplar enzimas e vias metabólicas ocorrendo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são responsáveis pelo estresse oxidativo (HASANUZZAMAN; NAHAR; FUJITA, 2013).

Em condições normais o estresse oxidativo é evitado devido à presença de um sistema antioxidante constituído de moléculas enzimáticas e não enzimáticas que são responsáveis por

fazerem a remoção das EROs, no entanto, em condições estressantes a atividade dessas moléculas pode não ser eficiente. Dentre as enzimas responsáveis por aliviarem os efeitos nocivos das EROs podemos citar a dismutase do superóxido (SOD), que é a primeira linha de defesa responsável por catalisar a dismutação do O_2^- em H_2O_2 e O_2 , e catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX) que são responsáveis por fazer a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 . A catalase opera sem a presença de um agente redutor, enquanto que a APX requer a presença de uma molécula redutora para fazer a remoção do H_2O_2 . Dessa forma, a catalase é energeticamente eficiente para a remoção de altas concentrações de H_2O_2 e a APX por apresentar maior afinidade por esse substrato é responsável pela eliminação quando o H_2O_2 está presente em pequenas quantidades (GILL; TUJETA, 2010; SILVA et al., 2017).

Geralmente, durante condições adversas ocorre maior atividade dessas enzimas a fim de eliminar as EROs e impedir que danos sejam causados no sistema, no entanto, para algumas espécies o aumento da atividade do sistema antioxidante não é suficiente para aliviar o estresse oxidativo, limitando o crescimento e desenvolvimento das plantas (SILVA et al., 2017), bem como, o estabelecimento *in vitro*.

Após a obtenção das plântulas *in vitro* por meio do cultivo de embriões zigóticos, é possível fazer a propagação desse material utilizando as técnicas de multiplicação *in vitro*, que permite a rápida multiplicação de genótipos geneticamente superiores, com uniformidade fisiológica, sendo possível obter elevado número de mudas isentas de doenças e com coloração e época de floração uniforme (KELLER et al., 2013), o que é importante para flores e plantas ornamentais. Com esse objetivo, meristemas de estrelícia (HOSNI, 2001), gemas axilares, segmentos foliares e embriões imaturos foram cultivados em meio MS, encontrando os primeiros resultados para a formação de plântulas *in vitro*, todavia não foram obtidos resultados satisfatórios para a multiplicação, pois foi obtido apenas 1,0 broto por explante (NORTH et al., 2011; PAIVA et al., 2004; ZIV; HALEVY, 1983), havendo a necessidade de otimizar o processo, utilizando para isso diferentes reguladores de crescimento.

Para a multiplicação, geralmente é realizada a suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento, principalmente com substâncias que atuam como citocininas. As citocininas são importantes para a superação da dominância apical, proliferação de gemas

laterais e multiplicação *in vitro*, contribuindo para o aumento da produção de biomassa (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010).

Dentre os reguladores de crescimento que atuam como citocinina, um dos mais utilizados durante o processo de propagação *in vitro* é a 6-benzilaminopurina (BAP), sendo esta muito eficiente na indução de gemas adventícias em diversas espécies (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010). Para *Heliconia bihai* (L.) L. com a utilização de 11 µM de BAP foi possível perceber aumento de 92,5% na formação de brotos, enquanto que *Etilingera elatior* com 31,08 µM de BAP ocorreu aumento de 78% (ULISSES et al., 2010; YUNUS et al., 2012).

Adicionalmente, estudos com o thidiazuron (TDZ) também tem sido realizados. O TDZ é um derivado sintético da fenilureia (N-fenil-1,2,3-tidiazol-5il-ureia), sendo uma das citocininas mais ativas e por isso mais eficiente do que compostos a base de adenina para a indução de brotação em algumas espécies. Utilizando esse regulador de crescimento na concentração de 2,2 µM ocorreu aumento de 6 brotos por explante em *Cotoneaster wilsonii*, uma espécie ornamental endêmica (SIVANESAN et al., 2011).

2.2.4 Aclimatização

Durante o cultivo *in vitro*, as plantas são expostas a um único microambiente que apresenta todos os nutrientes e a fonte de energia necessária para o crescimento, condições assépticas, baixa taxa de fluxo de fótons e alta umidade relativa. Esse microambiente causa o mínimo de estresse nas culturas e permite o crescimento ótimo, no entanto, as plantas provenientes do cultivo *in vitro* podem apresentar alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas, as quais limitam a adaptabilidade dessas plantas durante o processo de transferência para o ambiente *ex vitro* (CHANDRA et al., 2010; DIAS et al., 2014; XIAO; NIU; KOZAI, 2011). Dentre essas alterações estão à baixa deposição de cera epicuticular, anormalidades estomáticas, raízes não funcionais, que são consequência da falta de conexão vascular entre a raiz e a parte aérea, o que restringe a translocação de água e sais minerais e maquinaria fotossintética pouco desenvolvida (HAZARIKA, 2003).

Por esses motivos, a aclimatização gradual pode ser eficiente para melhorar o ajustamento às condições *ex vitro* (XIAO; NIU; KOZAI, et al., 2011). Muitas vezes, o controle da qualidade e da intensidade da radiação no ambiente *ex vitro* pode ser uma alternativa, visto que, uma das alterações é o pouco desenvolvimento da maquinaria fotossintética, o que pode ser responsável pela ocorrência de danos foto-oxidativos quando as plantas são expostas a maior intensidade de fluxo de fótons, prejudicando a sobrevivência das plantas (OSÓRIO; OSÓRIO; ROMANO, 2010). Além disso, a qualidade da radiação também pode influenciar, pois, podem proporcionar mudanças fisiológicas e morfológicas nos vegetais (NOMURA et al., 2009; OREN-SHAMIR et al., 2001), que permitem melhor adaptabilidade durante essa transição.

Dessa forma, telas fotoconversoras podem ser utilizadas, pois além de mudanças ópticas de dispersão e reflectância, são eficientes para modificar o espectro da radiação, o que pode otimizar a aclimatização das espécies, como ocorrido para banana (SILVA et al., 2014). As telas fotoconversoras azul apresentam pico principal de transmitância na região do verde-azul (400-540 nm), reduzindo os comprimentos de ondas vermelho e vermelho-distante, enquanto que a tela fotoconversora vermelha possui transmitância para comprimentos de ondas superiores a 590 nm, aumentando o vermelho e vermelho-distante e reduzindo azul, verde e amarelo (BRAGA et al., 2009; OREN-SHAMIR et al., 2001).

A radiação vermelha (600-700 nm) e azul (420-450 nm) apresentam importantes funções para as respostas fisiológicas e morfológicas nas plantas (BRAGA et al., 2009). Esses espectros de radiação são eficientemente absorvidos por clorofilas a (430-665 nm) e clorofilas b (453-642 nm) e são extremamente importantes para a fotossíntese, pois, a densidade do fluxo de fótons que é usado para esse processo está entre 400 e 700 nm. Além disso, a absorção na região do vermelho e vermelho distante está relacionada com o alongamento da parte área das plantas, fototropismo e gravitropismos, enquanto que a luz azul é importante para a síntese de clorofila, abertura estomática, fototropismo e fotomorfogênese (OUZOUNIS et al., 2015).

2.2.3 Criopreservação

Após o estabelecimento de um protocolo de cultivo *in vitro* é possível fazer a conservação do material, no entanto, para manutenção das espécies *in vitro* existe o risco de perda devido contaminação, erros humanos e variação somaclonal (PANIS; LAMBARDI, 2006). Assim, a criopreservação surge como uma alternativa para a conservação em longo prazo de diversas espécies (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Essa técnica consiste no armazenamento do material vegetal em temperaturas ultra-baixas, utilizando para isso nitrogênio líquido (-196°C) ou vapor (-150°C). Nessas temperaturas, as células se mantêm intactas, mas a atividade metabólica e a divisão celular são reduzidas permitindo o armazenamento por um longo período, contribuindo para a preservação da diversidade genética, principalmente de espécies raras e valiosas, bem como de importância comercial (PANIS; LAMBARDI, 2006; KULUS; ZALEWSKA, 2014). No entanto, para estrelícia, uma espécie muito utilizada na floricultura, ainda não foi relatado na literatura um protocolo para criopreservação.

Geralmente, para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação são utilizados tecidos que apresentem alta taxa de divisão celular e baixo conteúdo de água, (PANIS; LAMBARDI, 2006), uma vez que, o alto teor de água pode ocasionar a formação de cristais de gelo durante o resfriamento e aquecimento do explante, causando danos irreversíveis às membranas (PINTO et al., 2016). No entanto, além da escolha do material vegetal ideal, alguns procedimentos podem ser realizados para evitar que ocorra a formação desses cristais de gelo, como resfriamento e aquecimento rápido, bem como a desidratação do material. Dessa forma, o resfriamento é feito por meio da imersão em nitrogênio líquido, e para o aquecimento, geralmente, é utilizado banho-maria à 40°C por um curto período de tempo (REED, 2008; WEN; WANG, 2010; FERRARI et al. 2016). Já para a desidratação, são utilizadas diversas técnicas, que são dependentes do material a ser desidratado.

Para sementes ortodoxas, intermediárias, embriões zigóticos e pólen pode-se utilizar a desidratação em sílica-gel. Sendo que o período de exposição à sílica-gel deve ser suficiente

para garantir uma desidratação eficiente, sem causar efeitos citotóxicos que comprometam a viabilidade do explante, uma vez que, a intensa desidratação pode aumentar a concentração de sal intracelular podendo causar danos na membrana (KAVIANI, 2010; PINTO et al., 2016).

Dessa forma, a desidratação, resfriamento e aquecimento dos explantes durante a criopreservação induzem a estresses no material vegetal, o qual é suscetível a induzir modificações genéticas, anatômicas e fisiológicas em culturas criopreservadas e plantas regeneradas (KULUS; ZALEWSKA, 2014; PANIS; LAMBARDI, 2006). Dentre as alterações anatômicas observadas em plantas regeneradas após a criopreservação pode-se citar menor espessamento da lâmina foliar e dos tecidos internos como parênquima paliçádico e parênquima lacunoso. Muitas vezes, ocorrendo colapso das células do mesofilo (GANEVA et al., 2009), o que pode prejudicar a sobrevivência dessas plantas.

Além disso, as modificações genéticas podem causar conseqüentemente alterações fenotípicas indesejadas, sendo fundamental verificar a estabilidade genética do material após o processo de criopreservação (HARDING, 2004; KULUS; ZALEWSKA, 2014; PANIS; LAMBARDI, 2006). Atualmente, existem diferentes técnicas citológicas disponíveis para avaliar a instabilidade cromossômica das plantas criopreservadas, podendo avaliar poliploidia, aneuploidia e outras anormalidade mitóticas (HARDING, 2004). Uma das técnicas utilizadas é a citometria de fluxo que consiste em analisar partículas de forma individual e em alta velocidade, podendo mensurar o conteúdo de DNA e o nível de ploidia do vegetal. A quantidade de DNA é calculada pela relação entre o pico G1 da amostra/ posição do pico G1 de uma amostra padrão x o conteúdo de DNA da amostra padrão e é expressa em picogramas (pg), sendo que 1 pg corresponde a 978 Mpb. Já o nível de ploidia é uma estimativa obtida pela comparação do pico G1 da amostra com o pico G1 da amostra padrão (DOLEZEL et al., 1997; DOLEZEL; DOLEZELOVA; NOVAK, 1994).

REFERÊNCIAS

- AHMAD DAR, T. et al. Cumulative effect of gibberellic acid and phosphorus on crop productivity, biochemical activities and trigonelline production in *Trigonella foenum-graecum* L. **Cogent Food & Agriculture**, Seville, v. 1, n. 1, p. 995-950, 2015.
- AIELLO, D. et al. Pleiocarpon gen. nov. and a new species of *Ilyonectria* causing basal rot of *Strelitzia reginae* in Italy. **IMA fungus**, Ashtead, v. 8, n. 1, p. 65-76, 2017.
- AFTAB, T. et al. Stimulation of crop productivity, photosynthesis and artemisinin production in *Artemisia annua* L. by triacontanol and gibberellic acid application. **Journal of Plant Interactions**, Turim, v. 5, n. 4, p. 273-281, 2010.
- AKRAMGHADERI, F.; SOLTANI, A.; SADEGHIPOUR, H. R. Cardinal temperature of germination in medical pumpkin (*Cucurbita pepo* conver pepo var. styriaca), borago (*Borago officinalis* L.) and black cumin (*Nigella sativa* L.). **Asian Journal of Plant Science**, Dubai, v. 2, p. 101-109, 2008.
- BARBOSA, J. G. et al. Efeito da escarificação ácida e de diferentes temperaturas na qualidade fisiológica de sementes de *Strelitzia reginae*. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p. 71-77, 2005.
- BRAGA, F. T. et al. Qualidade de luz no cultivo in vitro de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, 2009.
- BESEMER, S.T. Germination methods for bird-of-paradise seed. **Flower and Nursery Report**, Davis, v.2, p.17-20, 1976.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2012.
- CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, Birmingham, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.
- DESAI, C.; INGHALIHALLI, R.; KRISHNAMURTHY, R. Micropropagation of *Anthurium andraeanum*-An important tool in floriculture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 4, n. 3,112-117, 2015.
- DIAS, G. M. Quality management of tropical plants. **Ornamental Horticulture**. Campinas, v. 22, n. 3, 256-258, 2016.

- DIAS, M. C. et al. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 117, n. 2, p. 213-224, 2014.
- DIAZ, P.M.A. Germination of *Strelitzia*. **Informaciones de Floricultura y Plantas Ornamentales**, La Coruna, v. 2, p.12-15, 1978.
- DOLEZEL, J. et al. Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. **Infomusa**, v. 6, n. 1, p. 6-9, 1997.
- DOLEŽEL, J.; DOLEŽELOVÁ, M.; NOVÁK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, v. 36, n. 3, p. 351, 1994.
- FERRARI, E. A. P. et al. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 172-177, 2016.
- GANEVA, T. et al. Structural responses of the photosynthetic apparatus of *Orthosiphon stamineus* Benth. to temperature stress after cryopreservation. **Botanica Serbica**, Belgrade, v. 33, n. 2, p. 163-167, 2009.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bari, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **CryoLetters**, Lewes, v. 25, n. 1, p. 3-22, 2004.
- HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bengaluru, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperatures, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. Abiotic stress—**Plant responses and applications in agriculture**. Rijeka: Intech, 2013. p. 169–205.
- HOSNI, A.M. Increasing the potential of in vitro propagation of *Strelitzia reginae* Aiton. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences**, Bahrain, v. 9, p. 839-852, 2001.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. **O mercado de flores no Brasil**. Disponível em: < <http://www.ibraflor.com/site/wp-content/uploads/2017/11/release-imprensa-ibraflor-10-2017.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

- ISHIHATA, K. Studies on promoting germination and seedling growth in *Strelitzia reginae*. **Bulletin of the Faculty of Agriculture**, Yamaguchi, v. 26, n.76, p.1-15, 1976.
- JUNQUEIRA, A. H; PEETZ, M. S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2014.
- KAVIANI, B. Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important germplasm: seed of Lily [*Lilium ledebourii*'(Baker) Bioss.], embryonic axe of Persian Lilac (*Melia azedarach*'L.), and Tea (*Camellia sinensis*' L.). **Plant Omics**, Queensland, v. 3, n. 6, p. 177-182, 2010.
- KELLER, E. R. J. et al., Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germoplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, 2013.
- KRAPP, A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. **Current opinion in plant biology**, London, v. 25, p. 115-122, 2015.
- KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. **Scientia Horticulturae**, British Columbia, v. 168, p. 88-107, 2014.
- LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. O. Produção de flores cortadas no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 120-126, 2009.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreirapreta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.
- LIMA, J. D.; FERRAZ, M. V. Cuidados na colheita e na pós-colheita das flores tropicais. Jornada nacional sobre o cultivo de plantas tropicais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 29-34, 2008.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. 2001. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1088 p.
- MEDEIROS, M. J. et al. Ecophysiological, anatomical and biochemical aspects of in vitro culture of zygotic *Syagrus coronata* embryos and of young plants under drought stress. **Trees**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 1219-1233, 2015.
- MONTERO-CORTÉS, M. et al. GA₃ induces expression of E2F-like genes and CDKA during in vitro germination of zygotic embryos of *Cocos nucifera* (L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dijon, v. 107, n. 3, p. 461-470, 2011.

- NOMURA, E. S et al. Crescimento e produção de antúrio cultivado sob diferentes malhas de sombreamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1394-1400, 2009.
- NORTH, J. J. et al. Effects of various media compositions on the in vitro germination and discoloration of immature embryos of bird of paradise (*Strelitzia reginae*). **Plant Omics Journal**, Queensland, v. 4, n. 2, p. 100-113, 2011.
- NORTH, J. J et al. Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. **International Journal of Physical Sciences**, Ota, v. 7, n. 4, p. 638-646, 2012.
- OREN-SHAMIR, M. et al. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p.353-361, 2001.
- OSÓRIO, M. L.; OSÓRIO, J; ROMANO, A. Chlorophyll fluorescence in micropropagated *Rhododendron ponticum* subsp. baeticum plants in response to different irradiances. **Biologia plantarum**, Praha, v. 54, n. 3, p. 415-422, 2010.
- OUZOUNIS, T. et al. Predawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa*. **Frontiers in plant science**, Switzerland, v. 6, p. 19-33, 2015.
- PÁDUA, M. S. et al. Influence of culture medium and age of zygotic embryos on *in vitro* germination of *Elaeis guineensis* Jacq. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 13, n. 14, p. 1515-1523, 2014.
- PAIVA, P. D. O.; ALMEIDA, E. F. A. **Produção de flores de corte**. Lavras: UFLA, 2012.
- PAIVA, P. D. O. et al. Estabelecimento in vitro de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, 2004.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J.; SONNINO, A. **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Rome: FAO, 2006. p. 61-78.
- PATEL, D. K. et al. Effect of nitrogen and phosphorus on growth, flowering and yield of bird of paradise (*Strelitzia reginae*) under shade net. **International Journal of Chemical Studies**, New Delhi, v. 5, n. 4, p. 1498-1500, 2017.

PECH Y AKÉ, A. A. et al. The effect of gibberellic acid on their *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, North Carolina, v. 43, n. 1, p. 247–253, 2007.

PINTO, M. S. et al. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 4, p. 380-389, 2016.

PRITCHARD, H.W.; BEEBY, L.A.; DAVIES, R.I. The role of embryo culture in the seed conservation of palms and other species. In: RAZDAN, M.K.; COCKING, E.C. **Conservation of genetic resources *in vitro***. Ardingley: Royal Botanic Gardens Kew, 1998. p. 89–138.

PRUDENTE, D. O. et al. Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 13-19, 2016.

QUEIROZ, J. R. G.; SILVA JR, A. C.; MARTINS, D. Herbicide selectivity in tropical ornamental species. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 795-802, 2016.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, North Carolina, v. 39, n. 5, p. 437-442, 2003.

REED, B. M. **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008.

ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. Alternative induction of *de novo* shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.120, n.3, p. 1087-1098, 2015.

SAMARFARD, S. et al. *In Vitro* propagation and detection of somaclonal variation in *Phalaenopsis gigantea* as affected by chitosan and thidiazuron combinations. **HortScience**, Alexandria, v. 49, n. 1, p. 82-88, 2014.

SEKIZAWA, K. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. **Plant Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 401-405, 2011.

SILVA, D. M. et al. The effect of magnesium nutrition on the antioxidant response of coffee seedlings under heat stress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 224, p. 115-125, 2017.

SILVA, R. A. L. et al. Leaf anatomy of genotypes of banana plant grown under coloured shade nets. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 13, n. 23, p. 2359-2366, 2014.

SINGH, R. et al. Recent Advances in Understanding the Role of Growth Regulators in Plant Growth and Development in vitro-III. Inhibitors of Growth Regulators. **Indian Forester**, New Delhi, v. 142, n. 11, p. 1065-1072, 2016.

SIVANESAN, I. et al. Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai—a rare endemic ornamental plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 1, p. 55-63, 2011.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. London: Academic Press; 2013.

SOUTO, A. G. L. et al. Effect of temperature on passion fruit emergence and seedling vigor. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 1, p. 50-57, 2017.

ULISSES, C. et al. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section explants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 11-18, 2010.

VAN DE VENTER, H. A.; SMALL, J.G.C. Evidence for the presence of a germination inhibitor in seeds of *Strelitzia* Ait. **Journal of South African Botany**, Pretoria, v.41, n.4, p.211-223, 1975.

VAN DE VENTER, H. A. Effect of various treatments on germination of dormant seeds of *Strelitzia reginae* Ait. **Journal of South African Botany**, Pretoria, v.44, n.2, p.103-110, 1978.

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

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011.

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

YUNUS, M. F. et al. *In vitro* propagation of *Etilingera elatior* (Jack)(torch ginger). **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 135, p. 145-150, 2012.

**ARTIGO 1: APLICAÇÃO EXÓGENA DE GA₃ E TEMPERATURA NO
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE ESTRELÍCIA**

RESUMO

Considerando que a propagação de estrelícia é limitada pela dormência das sementes e pelo pequeno número de brotos formados, e sendo essa uma espécie tropical, pode ser necessário que condições diferenciadas de reguladores de crescimento e de temperatura sejam utilizadas para a manutenção *in vitro*. Dessa forma, objetivou-se avaliar como o GA₃ e a temperatura afetam o desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de estrelícia. Embriões zigóticos foram excisados e inoculados em meio MS com diferentes concentrações de GA₃ (0, 5, 10 e 20 µM) e mantidos em diferentes temperaturas (25°C, 30/25°C e 30°C). Após 60 dias foi avaliada a germinação dos embriões (%), comprimento da parte aérea e da raiz (cm) e o efeito da temperatura na atividade da SOD, CAT e APX, além da atividade da redutase do nitrato e a estabilidade genética das plântulas na melhor concentração de GA₃ em comparação com o tratamento controle. Maior germinação dos embriões (72%) e comprimento da parte aérea das plântulas obtidas (3,14 cm) foram observados com a utilização de 20 µM de GA₃. Nessa concentração houve aumento da atividade da redutase do nitrato, sem alteração da estabilidade genética. A temperatura influenciou apenas no comprimento da parte aérea e da raiz, sendo maiores em 25°C. Na temperatura de 30°C ocorreu aumento da atividade da SOD e da APX quando comparado com 25°C. Assim, recomenda-se para o cultivo de embriões zigóticos, a adição de 20 µM de GA₃ ao meio de cultivo e manutenção na temperatura de 25°C.

Palavras-chave: *Strelitzia reginae*. Cultivo *in vitro*. Antioxidante. Giberelina. Redutase do nitrato.

ABSTRACT

Considering that the propagation of *Strelitzia* is limited by the dormancy of the seeds and by the small number of shoots formed *in vitro*, and being a tropical species, it may be necessary that differentiated conditions of growth regulators and temperature to be used for the maintenance *in vitro*. So, the objective was to evaluate how GA₃ and temperature affected the *in vitro* development of *Strelitzia*. Zygote embryos were excised and inoculated in MS medium with different concentrations of GA₃ (0, 5, 10 and 20 µM) and maintained at different temperatures (25°C, 30/25°C and 30°C). After 60 days, embryo germination (%), shoot length, root length (cm) and temperature effect on SOD, CAT and APX activity, have been evaluated, as well as nitrate reductase activity and the genetic stability of the seedlings in the best GA₃ concentration compared to the control treatment. Greater germination of the seedlings (72%) and shoot length (3.14 cm) were observed with the use of 20 µM of GA₃. In this concentration there was an increase in nitrate reductase activity, without altering the genetic stability. The temperature influenced only the length of shoot and the root, being bigger in 25°C. At 30°C, SOD and APX activity increased when compared to 25°C. Therefore, it is recommended to cultivate zygotic embryos, the addition of 20 µM GA₃ to the culture medium and maintenance at 25°C for development.

Keywords: *Strelitzia reginae*. *In vitro* culture. Antioxidant. Gibberellin. Nitrate reductase.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de embriões zigóticos é uma das técnicas mais viáveis da cultura de tecidos para espécies que apresentam problemas de propagação, principalmente devido à dormência apresentada por algumas sementes, como estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks ex Aiton). Todavia, o processo de regeneração desses explantes é uma etapa crítica (PAIVA et al., 2004; PECH Y AKÉ et al., 2007). Para algumas espécies, a suplementação do meio de cultura com ácido giberélico (GA₃), pode ser importante, pois este atua regulando a germinação de sementes e de embriões zigóticos, como pode ser visto para *Cocos nucifera* e *Syagrus coronata*, os quais apresentaram aumento de 33% e 30%, respectivamente, na germinação quando foram utilizadas concentrações de GA₃ de aproximadamente 3 µM até 15 µM (MEDEIROS et al., 2015; MONTERO-CORTÉS et al., 2011). Além disso, esse regulador de crescimento pode ser importante para o crescimento e alongamento celular, expansão das folhas e processos fotossintéticos, bem como, para a atividade de enzimas importantes do metabolismo, como a redutase do nitrato (GUPTA; CHAKRABARTY, 2013). O aumento da atividade da redutase do nitrato pode ser benéfico, visto que, essa enzima é responsável pela assimilação de nitrogênio, um elemento essencial encontrado em muitas macromoléculas e componentes do metabolismo secundário, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, componentes da parede celular, hormônios e vitaminas (KRAPP, 2015). Todavia, para que esses benefícios ocorram é importante balancear as concentrações dos reguladores de crescimento, visto que, o excesso desses compostos pode alterar a estabilidade genética das plantas (SAMARFARD et al., 2014).

Além dos fatores fisiológicos, a germinação dos embriões zigóticos e a regeneração das plântulas podem também ser afetadas pelas condições ambientais, sendo a temperatura um fator limitante por influenciar na absorção de água e na regulação de reações bioquímicas e enzimáticas (BEWLEY et al., 2014; ZUCARELI; HENRIQUE; ONO, 2015). Em estudos realizados com *Myrciaria* spp e *Rehmannia glutinosa*, o melhor desenvolvimento foi observado quando essas espécies foram mantidas em salas de crescimento com temperaturas de 5°C e 26/18°C, respectivamente, as quais são diferentes da comumente utilizada nas salas

de crescimento (25°C) (CUI et al., 2000; PICOLOTTO et al., 2007). No entanto, as temperaturas ótimas para germinação e desenvolvimento das plântulas são variáveis entre as espécies, e quando estão fora da faixa ótima podem causar estresse oxidativo e conseqüentemente aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo necessário avaliar a atividade de enzimas do sistema antioxidante das plantas em condições de diferentes temperaturas (MARUTANI et al., 2012; SOUTO et al., 2017), uma vez que, pode ocorrer prejuízos durante o estabelecimento *in vitro*.

Considerando que estrelícia (*Strelitzia reginae*) é uma espécie ornamental tropical com baixa taxa de propagação quando utilizados métodos convencionais como a divisão de touceiras e sementes, que devido dormência química e física apresenta taxa de germinação baixa e lenta, um protocolo de cultivo de embriões zigóticos pode ser um método eficaz de propagação em massa para a espécie (NORTH et al., 2012; PAIVA; ALMEIDA, 2012; ZIV; HALEVY, 1983). Assim, a suplementação com ácido giberélico (GA₃) pode contribuir para aumentar a eficiência da propagação, e por se tratar de uma espécie tropical o uso de temperaturas acima de 25°C também podem ser importantes para o sucesso do protocolo.

Dessa forma, objetivou-se avaliar como o uso de GA₃ influencia na germinação de embriões zigóticos, crescimento das plântulas, atividade da redutase do nitrato e estabilidade genética, bem como, o efeito de diferentes temperaturas da sala de crescimento na germinação de embriões zigóticos, crescimento das plântulas e atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Sementes maduras de estrelícia com coloração acinzentada foram coletadas de frutos deiscentes, a 21° 45' de latitude Sul e a 45° 00' de longitude Oeste, a uma altitude de 920 m e levadas para o laboratório onde foi realizado o beneficiamento, retirando-se o arilo. Posteriormente, seguindo protocolo adaptado de Paiva et al. (2004), realizou-se a assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar por meio da imersão por 30 segundos em álcool 70% e em seguida em hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos, sendo lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Após a assepsia, os embriões zigóticos foram excisados com auxílio de bisturi.

2.2 Efeito do GA₃ na germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento de plântulas de estrelícia

Após o processo de assepsia os embriões zigóticos foram inoculados em meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] acrescido de 0,4 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) (PAIVA et al., 2004) e diferentes concentrações de GA₃ (0, 5, 10 e 20 µM). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Para cada tratamento foram utilizados 32 embriões, os quais, após a inoculação, foram acondicionados no escuro a 25 ± 2°C por 7 dias e em seguida foram transferidos para sala de crescimento sob condições controladas (fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e irradiância de fótons de 36 µmol m⁻² s⁻¹) (ULISSES et al., 2010). Aos 7 dias após a inoculação avaliou-se a porcentagem de germinação dos embriões zigóticos (%), ou seja, aqueles embriões que apresentavam protrusão da radícula. Posteriormente, aos 60 dias realizou-se novamente a avaliação da porcentagem de germinação (%), comprimentos da raiz e de parte aérea (cm).

2.2.1 Atividade da redutase do nitrato

Para avaliação do efeito do GA₃ sobre a atividade da redutase do nitrato foram utilizadas plântulas de estrelicia com 60 dias, regeneradas a partir de embriões zigóticos cultivados em meio MS suplementado com 20 µM de GA₃, a qual foi a melhor concentração encontrada para a germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento das plântulas, e seu controle (0 µM de GA₃). Para as análises foi utilizado o protocolo descrito por Berger e Harrison (1995), sendo utilizada a parte aérea e a raiz das plântulas, em 9 repetições por tratamento, em esquema fatorial 2X2 (concentração de GA₃ X material vegetal).

2.2.2 Estabilidade genética

Para avaliação do efeito do GA₃ na estabilidade genética, plântulas regeneradas de embriões zigóticos inoculados em meio MS suplementado com 20 µM de GA₃ e seu controle (0 µM de GA₃) aos 60 dias após a inoculação foram avaliadas considerando o conteúdo de DNA e a ploidia por meio de análises de citometria de fluxo. Para isso, suspensões nucleares de 50 mg de folhas foram preparadas e os núcleos foram liberados das células cortando amostras desse material com lâminas de bisturi em 1 ml de tampão de extração de núcleos LB01 (DPOOLEŽEL, BINAROVÁ, LCRETI, 1989). A suspensão do núcleo foi inicialmente filtrada em malhas de 50 µm para remover os fragmentos, corada com 25 µL/mL de iodeto de propídeo e então as amostras foram analisadas por 4 minutos, sendo que pelo menos 6.000 núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência para a quantificação de DNA. O padrão de referência utilizado foi folha de ervilha (*Pisum sativum* – 9,09 pg). Para as análises foram realizadas 15 repetições por tratamento.

Os histogramas foram obtidos utilizando o citômetro FacsCalibur® (Becton Dickinson) e analisados com o programa Cell Quest (DICKINSON, 1998). As quantidades de DNA (pg) das plântulas foram obtidas por meio da equação: quantidade de DNA (pg) = (posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 da ervilha) x 9,09.

2.3 Efeito da temperatura na regeneração de embriões zigóticos e desenvolvimento de plântulas

Após o processo de assepsia das sementes de estrelícia, os embriões zigóticos foram excisados e inoculados em meio constituído de sais MS + 30 g. L⁻¹ de sacarose + 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] + 0,4 g L⁻¹ de PVP (PAIVA et al., 2004), suplementado com 20 µM de GA₃, a qual foi a melhor concentração encontrada para a germinação dos embriões zigóticos e para o desenvolvimento das plântulas. O pH foi do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Após inoculação, os embriões foram acondicionados em sala de crescimento e BODs com diferentes temperaturas (25°C, 30/25C° (dia/noite) e 30°C), sendo utilizados 20 embriões por tratamento, os quais permaneceram no escuro por 7 dias (ULISSES et al., 2010) e posteriormente em fotoperíodo de 16 horas. Aos 7 dias após a inoculação avaliou-se a porcentagem de germinação dos embriões zigóticos (%) e aos 60 dias realizou-se novamente a avaliação da porcentagem de germinação (%), comprimentos da raiz e parte aérea (cm).

2.3.1 Influência da temperatura no metabolismo antioxidante

Para avaliação do efeito da temperatura sobre o metabolismo antioxidante foram utilizadas plântulas dos tratamentos descritos no item anterior, sendo quantificada a atividade da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT). A obtenção do extrato enzimático foi obtida pela metodologia descrita por Biemelt et al. (1998). As atividades da SOD, APX e CAT foram determinadas pelos protocolos descritos por Giannopolitis e Ries (1977), Nakano e Asada (1981) e Havir e McHale (1987), respectivamente, sendo que um mesmo extrato enzimático havia parte aérea e sistema radicular.

2.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos ($P < 0,05$) pelo teste “F” as médias dos tratamentos qualitativos foram comparadas pelo teste de Skott-Knott ($P > 0,05$), enquanto que as médias obtidas em tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão e a escolha da equação foi baseada no maior coeficiente de determinação (R^2). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do GA₃ na germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento de plântulas de estrelícia

Aos 7 dias após a inoculação dos embriões zigóticos foi possível observar o início da germinação, com a protrusão da radícula em todos os tratamentos utilizados, no entanto, não foram observadas diferenças na porcentagem média de germinação entre os tratamentos nesse período. Após 60 dias, quando utilizada a concentração de 20 μM de GA₃, observou-se 72% de germinação, enquanto que na ausência desse regulador de crescimento, ocorreu 41% de germinação, verificando que o aumento da concentração de GA₃ promoveu um incremento de 31%. Resultados semelhantes foram encontrados para *Cocos nucifera* (L.) em que o uso de GA₃ aumentou em 50% a germinação de embriões zigóticos (MONTERO-CORTÉS et al., 2011).

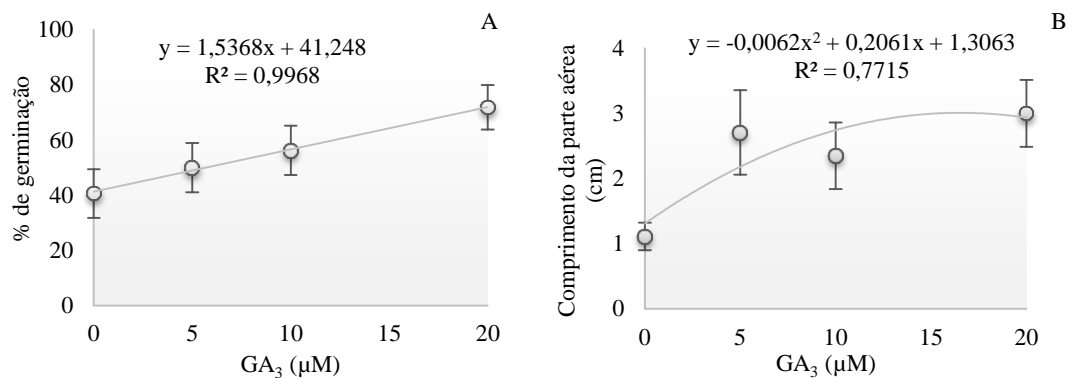


Figura 1: Porcentagem de germinação de embriões zigóticos (A) e comprimento da parte aérea de plântulas de estrelícia (B) em função de diferentes concentrações de GA₃ após 60 dias de cultivo. Os dados são expressos como média \pm erros padrão (barras).

Além disso, o aumento da concentração de GA₃ promoveu o melhor desenvolvimento da parte aérea, com comprimento médio de 3,14 cm com a concentração máxima calculada de 16,62 μM de GA₃, enquanto que na ausência desse regulador o comprimento da parte aérea

foi de apenas 1,12 cm (FIGURA 1B). Esse resultado provavelmente está associado à capacidade desse regulador de crescimento em aumentar a expressão dos genes que estão relacionados com a biossíntese da giberelina endógenas e de citocininas na parte aérea, o que causa aumento no tamanho das células e na divisão celular (LIU et al., 2018).

Já para o crescimento do sistema radicular, o GA₃ não foi importante para estrelícia, contrariando alguns estudos que indicam que aplicação exógena desse regulador de crescimento pode causar melhor desenvolvimento do sistema radicular, devido aumento da expressão de genes relacionados com a síntese e transporte de auxina (LIU et al., 2018). Dessa forma, para estrelícia não ocorreu diferença no comprimento do sistema radicular entre os tratamentos utilizados, apresentando média de 1,18 cm.

3.1.1 Efeito do GA₃ na atividade da redutase do nitrato

O uso de GA₃ promoveu aumento da atividade da redutase do nitrato (FIGURA 2), enzima essencial para a assimilação do nitrogênio (AHMAD DAR et al., 2015). Dessa forma, esse aumento pode ter contribuído para o melhor desenvolvimento das plântulas, visto que, essa enzima é responsável pela redução de nitrato em nitrito, sendo então a primeira reação para a assimilação de nitrogênio nas plantas, o qual está presente em muitas macromoléculas essenciais (KRAPP, 2015).

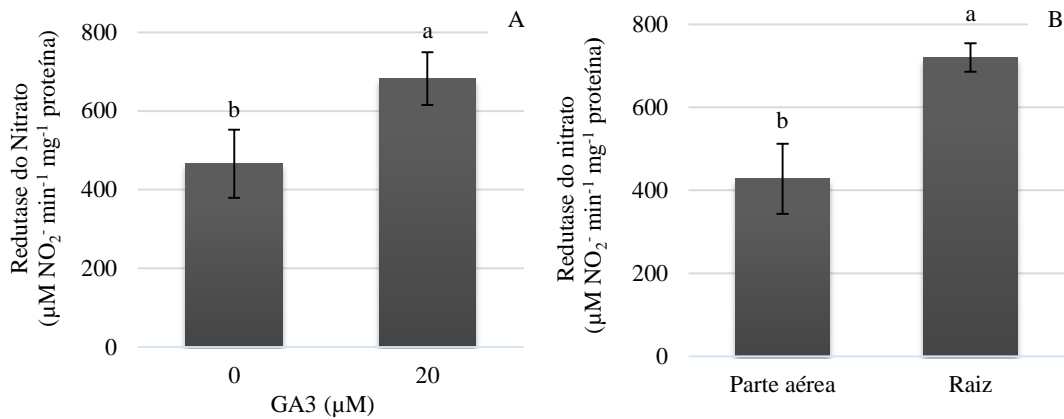


Figura 2: Atividade da enzima redutase do nitrato em plântulas de estrelícia em função da presença de GA₃ (A) e atividade da enzima na parte aérea e no sistema radicular de plântulas de estrelícia (B). Os dados são expressos como média ± erros padrão (barras). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Observou-se maior atividade dessa enzima em plântulas provenientes de embriões regenerados com 20 μM de GA₃ (682,27 μM NO₂⁻ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) quando comparado com plântulas na ausência desse regulador (465,54 μM NO₂⁻ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) (FIGURA 2A). Esse aumento de 32% na atividade da redutase do nitrato pode ser explicado pelo fato da aplicação exógena de GA₃ estar relacionado com a redução da concentração de ácido abscísico (ABA) livre (HAMAYUN et al., 2010), pois sabe-se que o ABA diminui e expressão dos genes dessa enzima, causando menor atividade (LU et al., 1992). Assim, na presença de GA₃ pode-se inferir que, possivelmente, ocorre maior expressão dos genes da redutase do nitrato.

Quanto ao material vegetal, independentemente da concentração de GA₃ verificou-se maior atividade da redutase do nitrato nas raízes (719,95 μM NO₂⁻ min⁻¹ mg⁻¹ proteína), sendo essa atividade 41% maior do que na parte aérea (427,86 μM NO₂⁻ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) (FIGURA 2B). Esse fato pode ser explicado pelo fato de que espécies que tem alta atividade da redutase do nitrato nas folhas utilizam poder redutor originado durante a etapa fotoquímica da fotossíntese e em plantas cultivadas *in vitro* tem-se baixa taxa fotossintética (OSÓRIO; OSÓRIO; ROMANO, 2010; ROBREDO et al., 2011). Assim, o nitrogênio precisa ter maior assimilação no sistema radicular utilizando poder redutor proveniente da respiração e via das

pentoses (BOWSHER; HUCKLESBY; EMES, 1989; ESPOSITO et al., 2005). Dessa forma, a translocação de nitrato para redução na folha ocorre apenas quando tem saturação das enzimas no sistema radicular, no entanto, o local predominante da redução é independente das taxas de crescimento, não interferindo no local de alocação de biomassa (SCHEURWATER et al., 2002), o que justifica o maior crescimento ter ocorrido apenas na parte aérea quando analisado o efeito das diferentes concentrações de GA₃.

3.1.2 Efeito do GA₃ na estabilidade genética das plântulas

Apesar da utilização de reguladores de crescimento ser benéfica ao crescimento e desenvolvimento das plantas, alterações negativas na estabilidade genética podem ser causadas (SAMARFARD et al., 2014). Dessa forma, podem ser utilizadas análises de citometria de fluxo que permitem a quantificação do conteúdo de DNA, bem como fazer uma estimativa do nível de ploidia, visto que, o tamanho do genoma é altamente correlacionado com o número de cromossomos. Para isso, podem ser feitas análises da fluorescência emitida por fluorocromo, como o iodeto de propídeo, o qual se liga ao DNA e ao RNA. Assim, quando tem aumento do conteúdo de DNA ocorre aumento da intensidade da fluorescência (DOLEŽEL; GREILHUBER; SUDA, 2004).

A utilização de GA₃ na concentração de 20 µM para otimizar a germinação de embriões zigóticos, bem como, o desenvolvimento das plântulas de estrelícia não apresentou efeito sobre a estabilidade genética das plântulas, visto que não houve diferenças na ploidia (FIGURA 3). Além disso, não apresentaram diferenças no conteúdo de DNA, que foi de 1,65 pg e 1,67 pg para plantas cultivadas na ausência e na presença de GA₃, respectivamente, sendo que o coeficiente de variação para esses resultados foram de 2,95 e 2,42. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados quando o GA₃ foi utilizado para alongamento da parte aérea de *Solanum melongena* que também não apresentou diferenças no conteúdo de DNA (XING et al., 2010), mantendo assim a estabilidade genética das plantas que são cultivadas *in vitro* com GA₃.

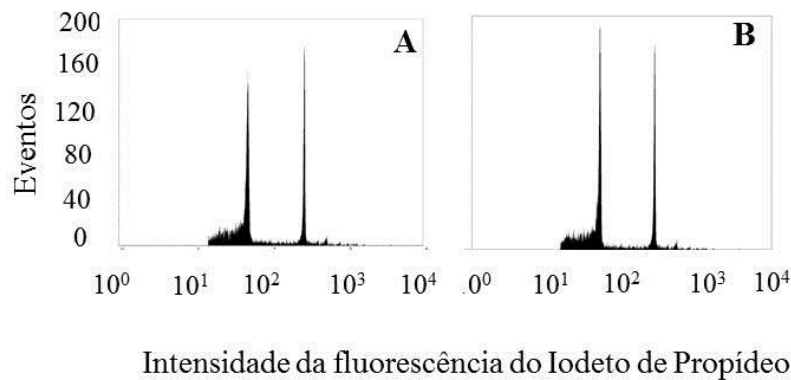


Figura 3: Histogramas da intensidade relativa do iodeto de propídeo usando núcleos de folhas de plântulas de estrelícia cultivadas em meio MS na ausência de GA₃ (A) e plântulas cultivadas em meio MS suplementado com 20 μM de GA₃ (B).

3.2 Influência da temperatura na regeneração de embriões zigóticos, desenvolvimento de plântulas e metabolismo antioxidante

Além do tratamento com o GA₃, o efeito da temperatura também foi avaliado na regeneração e desenvolvimento das plântulas. Não houve efeito da temperatura sobre a germinação dos embriões zigóticos de estrelícia, tanto aos 7 como aos 60 dias, após a inoculação, ocorrendo 67% de embriões germinados. No entanto, após 60 dias, o comprimento da parte aérea foi maior na temperatura constante de 25°C (2,83 cm) e na alternada de 30/25°C (2,72 cm) (FIGURA 4A). Para o comprimento da raiz os maiores valores (2,6 cm) foram encontrados apenas sob condições de temperatura constante de 25°C, enquanto que os tratamentos com temperaturas alternadas de 30/25°C e 30°C apresentaram comprimento de 1,53 cm e 1,17 cm, o que corresponde a uma redução de 41% e 55%, respectivamente, em relação ao uso de 25°C (FIGURA 4B).

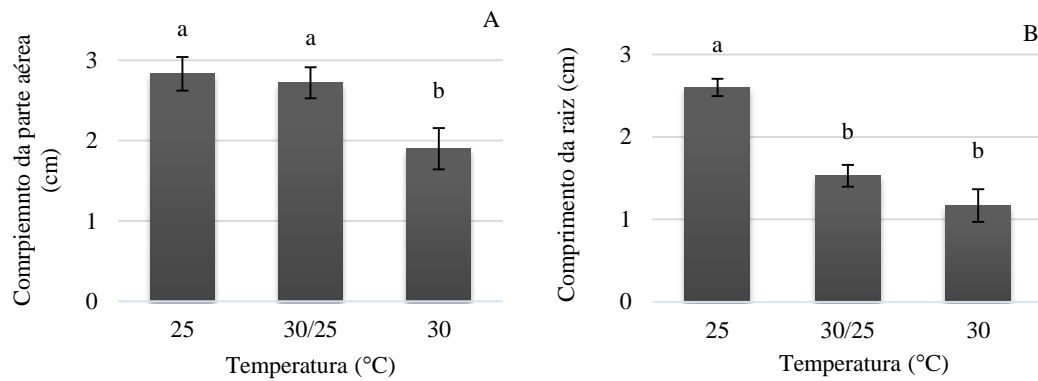


Figura 4: Influência das temperaturas constantes de 25°C e 30°C e alternada de 30°C/25°C sobre o comprimento da parte aérea (A) e comprimento da raiz (B) após 60 dias. Os dados são expressos como média \pm erros padrão (barras). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Em muitos casos, essa redução do crescimento com o aumento da temperatura está relacionada com alterações de processos metabólicos, uma vez que, ocorre desnaturação de proteínas, inativação enzimática e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a perda de vigor e desenvolvimento anormal das plantas (HEMANTARANJAN et al., 2014). No entanto, a presença de um sistema antioxidante pode minimizar o efeito deletério das EROs (HASANUZZAMAN; NAHAR; FUJITA, 2012).

No cultivo de estrelícia, com o aumento da temperatura ocorreu também aumento da atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante. Assim, plântulas de estrelícia que se desenvolveram na temperatura de 30°C apresentaram atividade da SOD e da APX mais elevadas quando comparadas com a temperatura de 25°C e com a temperatura alternada de 30/25 °C (FIGURA 5).

A atividade da SOD foi de 0,91 U SOD μg^{-1} proteína na temperatura de 30°C o que corresponde a 40% e 32% a mais na atividade dessa enzima quando comparado com a temperatura de 25°C (0,55 U SOD μg^{-1} proteína) e 30/25°C (0,62 U SOD μg^{-1} proteína), respectivamente (FIGURA 5A). Esse aumento na atividade da SOD evita a formação de radical hidroxila via reação de Haber-Weiss. No entanto, por ser a primeira linha de defesa, acarreta na formação de H_2O_2 que também causa problemas de oxidação no sistema, assim, apenas o aumento da atividade dessa enzima não é suficiente para a eficiência do sistema

antioxidante. Dessa forma, a presença de enzimas, como a APX e CAT, que levam a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 é de extrema importância para aliviar os efeitos do estresse oxidativo (GILL; TUJETA, 2010; SILVA et al., 2017).

A atividade da APX na temperatura mais elevada (30°C) foi de $10,28 \mu\text{mol}$ de ascorbato (AsA) $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína enquanto que em 25°C foi $7,73 \mu\text{mol}$ AsA $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína e em $30^\circ/25^\circ\text{C}$ foi $6,68 \mu\text{mol}$ AsA $\text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína, o que corresponde a um aumento de 25% e 35% na atividade quando comparada a temperatura de 30°C com a de 25°C ou $30^\circ/25^\circ\text{C}$, respectivamente (FIGURA 5B). Já a atividade da CAT apresentou atividade média de $0,30 \mu\text{mol}$ H_2O_2 $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, não diferindo entre as temperaturas avaliadas. Isso pode ser explicado pelo fato da CAT operar sem a presença de um agente redutor se tornando energeticamente eficiente para a remoção apenas de altas concentrações de H_2O_2 e a APX ser responsável pela eliminação quando o H_2O_2 está presente em pequenas quantidades, devido maior afinidade por esse substrato (GILL; TUJETA, 2010; SILVA et al., 2017). No entanto, a CAT apresenta alta taxa de conversão, sendo possível fazer a dismutação de 6 milhões de moléculas de H_2O_2 para H_2O e O_2 por minuto, e por isso, sua atividade é indispensável para o aliviar o estresse oxidativo de muitas espécies (GILL; TUJETA, 2010). Assim, apenas o aumento da atividade enzimática da SOD e da APX pode não ter sido suficiente para aliviar o estresse causado pelas altas temperaturas, comprometendo o desenvolvimento de estrelícia.

Além disso, para muitas espécies, em condições extremas o aumento da atividade do sistema antioxidante não é suficiente para aliviar o estresse oxidativo, devido a produção muito elevada das EROs, impedindo que essas sejam eliminadas (SILVA et al., 2017), limitando o crescimento, desenvolvimento e estabelecimento *in vitro* das plantas. Dessa forma, a temperatura de 25°C , comumente utilizada em salas de crescimento, permite melhor desenvolvimento das plântulas de estrelícia.

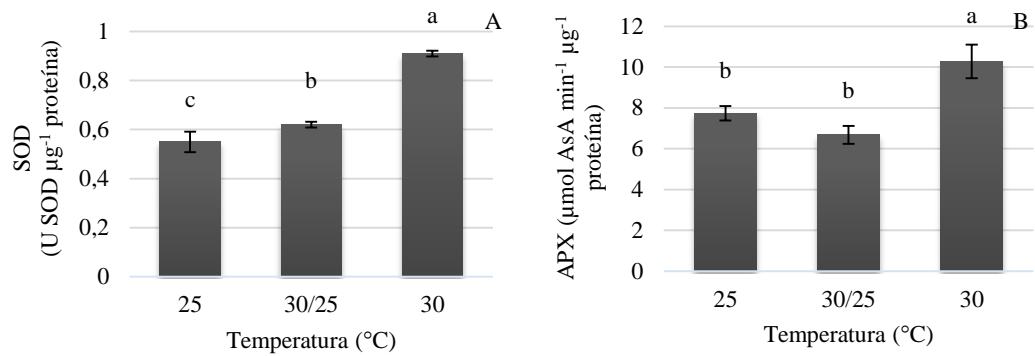


Figura 5: Atividade das enzimas SOD (A) e APX (B) em plântulas de estrelícia submetidas às diferentes condições de temperaturas (25°C, 30°C/25°C e 30°C). Os dados são expressos como média \pm erros padrão (barras). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

4 CONCLUSÕES

O uso de 20 μM de GA_3 acrescido ao meio de cultura proporciona melhor germinação de embriões zigóticos, maior crescimento das plântulas e atividade da redutase do nitrato, não causando alterações na estabilidade genética das plântulas. A temperatura recomendada para o crescimento das plântulas de estrelícia é de 25°C, sendo que em 30°C ocorre maior atividade das enzimas SOD e APX. Assim, para o estabelecimento *in vitro* de estrelícia deve-se utilizar a concentração de 20 μM de GA_3 , com temperatura de 25°C na sala de crescimento.

REFERÊNCIAS

- AHMAD DAR, T. et al. Cumulative effect of gibberellic acid and phosphorus on crop productivity, biochemical activities and trigonelline production in *Trigonella foenum-graecum* L. **Cogent Food & Agriculture**, Seville, v. 1, n. 1, p. 995-950, 2015.
- BERGES, J. A.; HARRISON, P. J. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, New York, v. 40, n. 1, p.82-93, 1995.
- BEWLEY J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. New York: Springer, 2012.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Glasglow, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BOWSHER, C.G., HUCKLESBY, D.P., EMES, M. J. Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum* L. **Planta**, Berlin, v. 177, n. 3, p. 359-366, 1989.
- CUI, Y. et al. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 219-226, 2000.
- DICKINSON, B. **Cell quest software: reference manual**. San Jose: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 1998.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J.. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233, 2007.
- DPOOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P; LCRETI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia plantarum**, Praha, v. 31, n. 2, p. 113-120, 1989.
- ESPOSITO S. et al. Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: the dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 56, n. 409, p. 55-64, 2004.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, Glasgow, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, Bari, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GUPTA, R.; CHAKRABARTY, S. K. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. **Plant signaling and behavior**, v. 8, n. 9, p. e25504, 2013.

HAMAYUN, M. et al. Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth and salt stress tolerance. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington v. 58, n. 12, p. 7226-7232, 2010.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M. Extreme temperatures, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. **Abiotic stress—plant responses and applications in agriculture**. Rijeka: Intech, 2013, p. 169–205.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

HEMANTARANJAN, A. et al. Heat stress responses and thermotolerance. **Advances in Plants and Agriculture Research**, Tucson, v. 1, n. 12, p. 10.15406, 2014.

KRAPP, Anne. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. **Current opinion in plant biology**, London, v. 25, p. 115-122, 2015

LIU, Q. et al. Exogenous GA₃ application altered morphology, anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in *Eucalyptus grandis*. **Protoplasma**, Karlsruhe, p. 1-13, 2018.

LU, J.; ERTL, J. R.; CHEN, C. Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 98, n. 4, p. 1255-1260, 1992.

MARUTANI, Y. et al. Damage to photosystem II due to heat stress without light-driven electron flow: involvement of enhanced introduction of reducing power into thylakoid membranes. **Planta**, Berlin, v. 236, n. 2, p. 753-761, 2012.

MEDEIROS, Maria Jaislanny et al. Ecophysiological, anatomical and biochemical aspects of in vitro culture of zygotic *Syagrus coronata* embryos and of young plants under drought stress. **Trees**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 1219-1233, 2015.

MONTERO-CORTÉS, M. et al. GA₃ induces expression of E2F-like genes and CDKA during in vitro germination of zygotic embryos of *Cocos nucifera* (L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 3, p. 461-470, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NORTH, J. J. et al. Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. **International Journal of Physical Sciences**, Ota, v. 7, n. 4, p. 638-646, 2012.

OSÓRIO, M. L.; OSÓRIO, J.; ROMANO, A. Chlorophyll fluorescence in micropropagated *Rhododendron ponticum* subsp. baeticum plants in response to different irradiances. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 3, p. 415-422, 2010.

PAIVA, P. D. O. et al. Estabelecimento in vitro de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, 2004.

PAIVA, P. D. O.; ALMEIDA, E. F. A. **Produção de flores de corte**. Lavras: UFLA, 2012.

PECH Y AKÉ, A. A. et al. The effect of gibberellic acid on their in vitro germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, North Carolina, v. 43, p. 247-253, 2007.

PICOLOTTO, L. et al. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, 2007.

SAMARFARD, S. et al. *In Vitro* propagation and detection of somaclonal variation in *Phalaenopsis gigantea* as affected by chitosan and thidiazuron combinations. **HortScience**, Alexandria, v. 49, n. 1, p. 82-88, 2014.

SCHEURWATER, I. et al. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast-and slow-growing grass species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 374, p. 1635-1642, 2002.

SILVA, D. M. et al. The effect of magnesium nutrition on the antioxidant response of coffee seedlings under heat stress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 224, p. 115-125, 2017.

SOUTO, A. G. L. et al. Effect of temperature on passion fruit emergence and seedling vigor. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 1, p. 50-57, 2017.

ULISSES, C. et al. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section explants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 11-18, 2010.

XING, Y. et al. High efficiency organogenesis and analysis of genetic stability of the regenerants in *Solanum melongena*. **Biologia plantarum**, Praha, v. 54, n. 2, p. 231-236, 2010.

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

ZUCARELI, V.; HENRIQUE, L. A. V.; ONO, E. O. Influence of light and temperature on the germination of *Passiflora incarnata* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 162-167, 2015.

**ARTIGO 2: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO *in vitro* E
ACCLIMATIZAÇÃO DE ESTRELÍCIA**

RESUMO

A micropropagação pode ser uma alternativa viável para a reprodução de estrelícia, devido às dificuldades de propagação que a espécie apresenta. No entanto, mudas produzidas *in vitro* podem apresentar limitações durante a multiplicação e aclimatização, havendo necessidade de desenvolver uma metodologia para otimizar essas etapas. Dessa forma, objetivou-se otimizar o processo de multiplicação com acréscimo de citocinina ao meio de cultura e a aclimatização de plantas de estrelícia utilizando telas fotoconversoras. Brotações com 2,0 cm obtidas da germinação de embriões *in vitro* foram excisadas e inoculadas em meio MS suplementado com 0, 5, 10 e 20 μM de BAP ou 0, 5, 10 e 15 μM de TDZ. Para a aclimatização, as plântulas com 60 dias provenientes da germinação de embriões *in vitro*, foram transferidas para recipientes plásticos com substrato comercial Tropstrato[®] e mantidas em sala de crescimento na ausência de telas fotoconversoras e com telas vermelha e azul. Os resultados demonstraram que 20 μM de BAP proporcionou maior formação de brotações (1,46), porém, apresentou redução do comprimento da parte (2,71), além de incremento da oxidação do meio de cultura (2,53). Já o uso de TDZ não estimulou a formação de novas brotações. Durante a aclimatização, a maior taxa de sobrevivência (66,7%) ocorreu para as plantas mantidas sem as telas fotoconversoras. Assim, pode-se concluir que o uso de 20 μM de BAP é indicado para a multiplicação de estrelícia, não sendo indicado o uso de telas fotoconversoras durante a etapa de aclimatização.

Palavras-chave: *Strelitzia reginae*. Multiplicação. Citocininas. Telas fotoconversoras.

ABSTRACT

Micropropagation can be a viable alternative for the reproduction of *strelitzia*, due to the difficulties of propagation that the species presents. However, *in vitro* produced seedlings may present limitations during multiplication and acclimatization, and it is necessary to develop a methodology to optimize these steps. In this way, the objective was to optimize the multiplication and acclimatization process of *strelitzia*. Shoots with 2.0 cm obtained from *in vitro* embryo germination were excised and inoculated in MS medium supplemented with 0, 5, 10 and 20 μM BAP or 0, 5, 10 and 15 μM TDZ. For acclimatization, the plants after germination of *in vitro* embryos were transferred to plastic containers with Tropstrato[®] commercial substrate and kept in a growth room in the absence of coloured shade nets and with red and blue nets. The results showed that 20 μM of BAP provided a higher shoot formation (1.46), but showed a reduction in shoot length (2.71), as well as increased oxidation of the culture medium (2,53). However, the use of TDZ did not stimulate the formation of new shoots. During acclimatization, the highest survival rate (66.7%) occurred for plants maintained without coloured shade nets. So, it can be concluded that the use of 20 μM of BAP is indicated for the multiplication of *strelitzia*, not being indicated the use of coloured shade nets during the acclimatization stage.

Keywords: *Strelitzia reginae*. Multiplication. Cytokinins. Coloured shade nets.

1 INTRODUÇÃO

A micropropagação permite a rápida multiplicação *in vitro* de genótipos geneticamente superiores e isentos de doenças, sendo uma alternativa viável para plantas que apresentam dificuldade na propagação convencional, como o caso de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks ex Aiton), uma planta ornamental tropical que apresenta dormência química e física das sementes e pequeno número de brotos formados a partir da divisão de rizomas (KELLER et al., 2013; PAIVA et al., 2004).

Para a multiplicação *in vitro*, geralmente é realizada a suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento, principalmente com substâncias que atuam como citocininas. Dentre esses reguladores de crescimento, um dos mais utilizados durante o processo de propagação *in vitro* é a 6-benzilaminopurina (BAP) (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010). Essa citocinina é muito eficiente na indução de gemas adventícias em diversas espécies, como já foi constatado para *Heliconia bihai* (L.) L. e *Etilingera elatior*, as quais apresentam aumento de 92,5% e 78% na indução de brotações quando utilizadas as concentrações de 11 μM e 31,08 μM de BAP, respectivamente (ULISSES et al., 2010; YUNUS et al., 2012). No entanto, para estrelícia, tem-se a média de 1,0 broto por explante obtido da germinação de embriões zigóticos na presença de 40 μM de BAP (PAIVA et al., 2004), havendo, assim, a necessidade de novos estudos para a propagação e produção de mudas *in vitro*.

Adicionalmente, estudos com o thidiazuron (TDZ) também tem sido realizados, sendo que com a utilização desse regulador de crescimento na concentração de 2,2 μM ocorreu aumento de 6 brotos por explante em *Cotoneaster wilsonii*, uma espécie ornamental endêmica (SIVANESAN et al., 2011).

Essas plantas provenientes da micropropagação podem apresentar limitações de adaptabilidade durante o processo de transferência para o ambiente *ex vitro*, uma vez que, durante o cultivo *in vitro*, devido às condições controladas do meio de cultura, condições assépticas, baixas taxas de fluxo de fótons e alta umidade relativa podem ocorrer alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas nas plantas (DIAS et al., 2014; XIAO; NIU; KOZAI,

2011). Assim, o controle da intensidade e da qualidade da radiação na etapa de aclimatização pode ser uma alternativa viável para aumentar a sobrevivência das plantas durante essa etapa, visto que, o aumento da densidade de fluxo de fótons no ambiente *ex vitro* pode ocasionar danos foto-oxidativos no aparato fotossintético (OSÓRIO; OSÓRIO; ROMANO, 2010).

Dessa forma, telas fotoconversoras podem ser utilizadas, pois além de mudanças ópticas de dispersão e reflectância, são eficientes para modificar o espectro da radiação, o que pode otimizar a aclimatização das espécies, como ocorrido para banana (SILVA et al., 2014). Sabe-se que a radiação vermelha (600-700 nm) e azul (420-450 nm) apresentam importantes funções para as respostas fisiológicas e morfológicas nas plantas, sendo importantes para o processo fotossintético, alongamento da parte aérea, fototropismos, gravitropismos, síntese de clorofila, abertura estomática e fotomorfogênese (BRAGA et al., 2009; OUZOUNIS et al., 2015). Dessa forma, a utilização de telas fotoconversoras azul e vermelha, as quais apresentam pico principal de transmitância na região do verde-azul (400-540 nm) e vermelho e vermelho-distante (superiores a 590 nm), respectivamente, pode contribuir para o melhor desenvolvimento das plântulas durante a aclimatização (BRAGA et al., 2009; OREN-SHAMIR et al., 2001).

Assim, objetivou-se desenvolver uma metodologia para a multiplicação *in vitro* utilizando BAP e TDZ e um protocolo utilizando telas fotoconversoras durante a aclimatização de plantas de estrelícia regeneradas a partir do cultivo de embriões zigóticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Sementes maduras de estrelícia com coloração acinzentada foram coletadas de frutos deiscentes, a 21° 45' de latitude Sul e a 45° 00' de longitude Oeste, a uma altitude de 920 m e levadas para o laboratório onde foi realizado o beneficiamento, retirando-se o arilo. Posteriormente, seguindo protocolo adaptado de Paiva et al. (2004), realizou-se a assepsia das

sementes em câmara de fluxo laminar por meio da imersão por 30 segundos em álcool 70% e em seguida em hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos, sendo lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Após a assepsia, os embriões zigóticos foram excisados com auxílio de bisturi e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g. L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] acrescido de 0,4 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) (PAIVA et al., 2004) e 20 µM de ácido giberélico (GA₃). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Após a inoculação, os embriões foram acondicionados no escuro por 7 dias (ULISSES et al., 2010) e, em seguida, transferidos para sala de crescimento sob condições controladas (fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e irradiância de fótons de 36 µmol m⁻²s⁻¹) onde foram mantidos por 60 dias.

2.2 Efeito do BAP e TDZ na multiplicação de plantas de estrelícia

Brotos da região terminal da parte aérea com aproximadamente 2 cm, oriundos das plântulas já estabelecidas *in vitro*, foram transferidos para meio MS acrescido de 30 g. L⁻¹ de sacarose + 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] + 0,4 g L⁻¹ de PVP (PAIVA et al., 2004) suplementado com 0, 5, 10 e 20 µM de BAP ou 0, 5, 10 e 15 µM de TDZ com pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro por 7 dias (ULISSES et al., 2010) e posteriormente foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Aos 60 dias após a inoculação avaliaram-se: número de brotações, comprimento da parte aérea (cm) e oxidação dos explantes. Essa oxidação foi classificada com notas 0, 1, 2 e 3, sendo que a nota 3 foi atribuída quando o meio de cultura apresentou total oxidação, enquanto que os meios de cultura que não apresentaram receberam nota 0 (FIGURA 1).

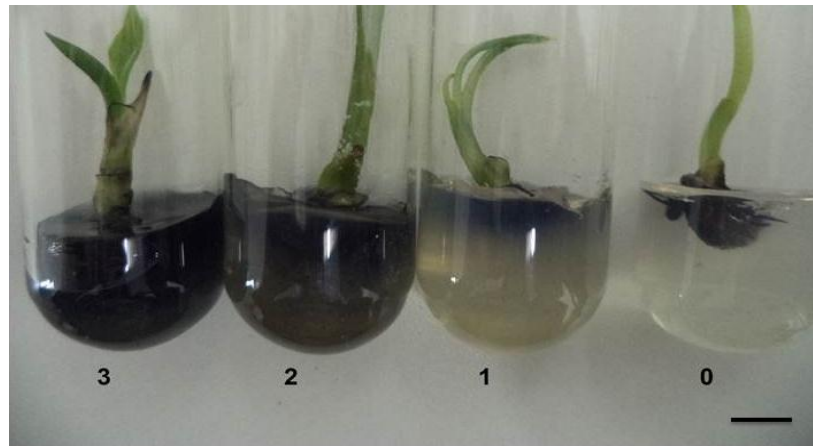


Figura 1: Escala de oxidação de estrelícia quando submetida a diferentes concentrações de BAP e TDZ. Nota 3 atribuída a maior oxidação e nota 0 ausência de oxidação. Barra: 1 cm

2.3 Efeito de telas fotoconversoras na aclimatização de plantas de estrelícia

Plântulas de estrelícia já desenvolvidas com raiz, provenientes da germinação de embriões zigóticos desenvolvidos em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel[®] acrescido de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de polivinilpirrolidona (PVP) (PAIVA et al., 2004) e $20 \mu\text{M}$ de ácido giberélico (GA_3), após 60 dias de inoculação, foram transferidas para recipientes plásticos de 200 mL contendo substrato comercial Tropstrato[®] e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com irradiância de fótons de $76 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Para avaliação do efeito das telas fotoconversoras utilizaram-se telas com 50% de sombreamento vermelha e azul. Adicionalmente, algumas plantas foram cultivadas na ausência das telas, sendo utilizadas como controle. O período de aclimatização compreendeu 45 dias, nos primeiros 30 dias as plantas permaneceram cobertas com sacos plásticos transparentes e nos últimos 15 dias ficaram sem a presença desse material. Após 45 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência (%).

2.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 15 repetições por tratamento sendo 1 plântula por tubo na multiplicação e 1 planta por recipiente plástico durante a aclimatização. Os dados obtidos nos diferentes experimentos foram submetidos à análise de variância e quando significativos ($P < 0,05$) pelo teste “F” as médias dos tratamentos qualitativos foram comparadas pelo teste de Skott-Knott ($P > 0,05$), enquanto que as médias obtidas em tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão e a escolha da equação foi baseada no maior coeficiente de determinação (R^2). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do BAP e TDZ na multiplicação de plantas de estrelícia

Para a multiplicação *in vitro* de estrelícia, foram utilizadas diferentes concentrações de BAP e TDZ, no entanto, o uso de TDZ não estimulou a formação de brotos. Com essa ausência de resposta pode-se inferir que as concentrações utilizadas não foram suficientes para aumentar a atividade de citocininas endógenas e para inibir a oxidase/desidrogenase da citocinina, ou ainda, foram muito elevadas o que causou desbalanceamento hormonal, podendo ter aumentado a concentração de outros fitormônios, como etileno, o que prejudica o desenvolvimento *in vitro* (HUTCHINSON et al., 2014; KLEMS et al., 2011; NISLER et al., 2016).

Já com a utilização de BAP os resultados demonstraram que após 60 dias de cultivo foi possível obter até 4 brotos por explante, sendo a média máxima de 1,46 (FIGURA 2).



Figura 2: Brotações de estrelícia obtidas após 60 dias de inoculação dos explantes em meio MS suplementado com 20 μM de BAP.

O meio MS suplementado com 20 μM de BAP induziu a formação de 1,46 brotos por explante, sendo esse valor 46% maior quando comparado com o tratamento controle, o qual não apresentou nova formação de brotos. Assim, pode-se observar tendência de aumento nos números de brotações quando utilizou BAP no meio de cultura (FIGURA 3A). Respostas positivas ao uso de BAP podem estar relacionadas com o rápido transporte através da membrana plasmática e a rápida habilidade da célula de metabolizar esse fitoregulador quando comparado com outras citocininas (MALIK et al., 2005). Resultados satisfatórios também foram encontrados em outras espécies ornamentais, sendo que o uso de 11 μM de BAP promoveu a formação de 1,64 brotos em *Heliconia bihai* (L.) (ULISSES et al., 2010) e 22,2 μM de BAP induziu a formação de 3,67 brotos em *Etilingera elatior* (ABDELMAGEED et al., 2011).

Contudo, o comprimento das brotações foi maior apenas até a concentração estimada de 6,65 μM (4,35 cm), ocorrendo menor crescimento acima dessa concentração. Dessa forma, o uso de 20 μM de BAP produziu brotações com comprimento médio de 2,71 cm, reduzindo assim de 37,7% e 34,9% (4,16 cm) quando comparado com o ponto de máxima estimado e com a média das brotações no tratamento controle, respectivamente (FIGURA 3B). Esses resultados eram esperados, pois concentrações mais elevadas de BAP podem causar encurtamento das brotações (VASCONCELOS et al., 2012), e também ocorreu quando 17,8 μM de BAP foi utilizado para a indução de brotações em embriões zigóticos de estrelícia,

sendo que nesse trabalho as brotações apresentaram aproximadamente 0,6 cm, enquanto que na ausência de BAP o comprimento médio foi de 1,22 cm (PAIVA et al., 2004).

A suplementação com BAP também causou maior oxidação do meio de cultura, sendo que com 20 μM de BAP ocorreu oxidação de 2,53 de acordo com a escala utilizada. Esse valor representa aumento de 31% quando comparado com o tratamento controle (1,93), podendo observar tendência de aumento linear (FIGURA 3C). Esse incremento pode ser justificado pela maior exsudação de compostos fenólicos na presença de reguladores de crescimento, como foi observado em trabalhos iniciais relacionados com a oxidação de estrelicia (NORTH et al., 2012). Assim, com 20 μM de BAP foi possível obter maior indução de brotações (média de 1,46 brotos/explante), mas esses apresentaram redução do comprimento e aumento da oxidação do meio de cultura. No entanto, essa oxidação não influencia no desenvolvimento normal das plantas, como foi relatado em trabalhos realizados para controle de oxidação nessa espécie, não ocorrendo amarelamento ou queima das plantas nessas condições (PAIVA; PAIVA; PASQUAL, 2007).

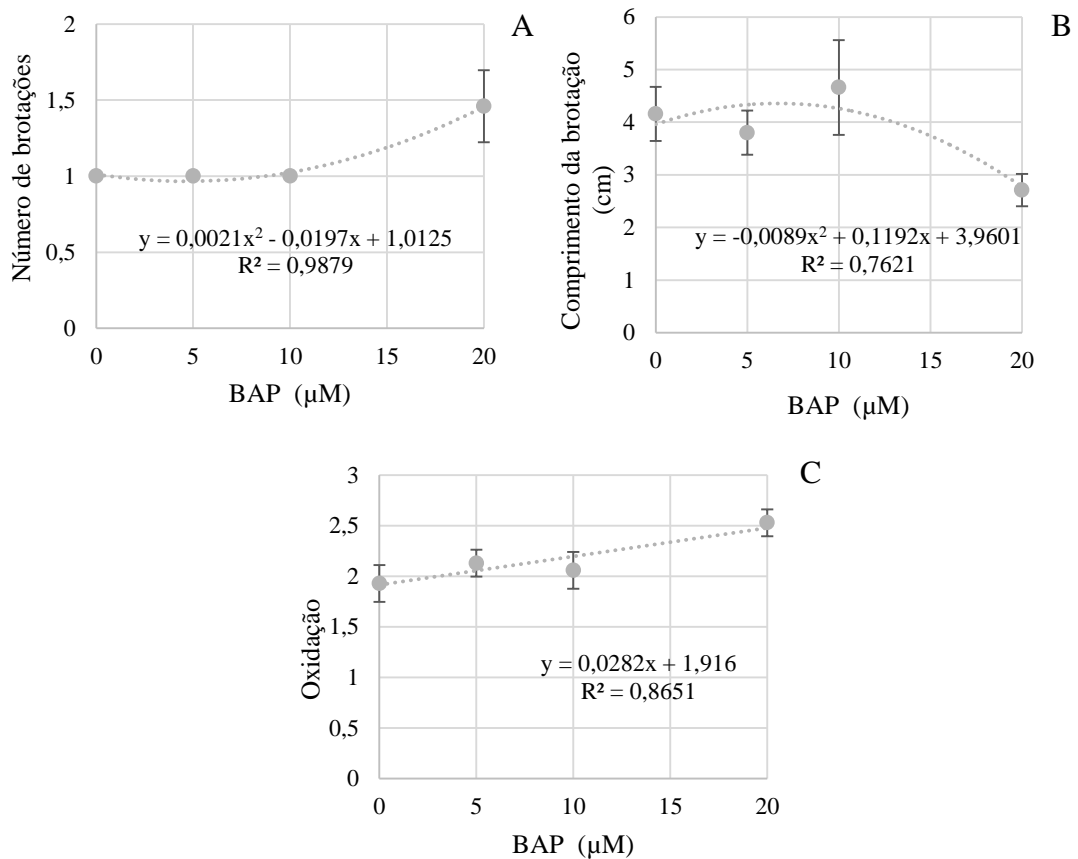


Figura 3: Número de brotações (A), comprimento das brotações (B) e ocorrência de oxidação (C) de plântulas de estrelícia cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de BAP (0, 5, 10 e 20 μM) após 60 dias. Os dados são expressos como média \pm erros padrão (barras).

3.2 Efeito de telas fotoconversoras na aclimatização de plantas de estrelícia

Poucos trabalhos avaliam o efeito da qualidade e da intensidade da radiação durante a aclimatização de plantas produzidas *in vitro* (RODRIGUES et al., 2015), havendo, assim a necessidade de realizar um estudo específico para cada espécie. Para estrelícia, a utilização de telas fotoconversoras, para controlar tanto a qualidade quanto a intensidade de radiação, devido mudanças ópticas de dispersão e reflectância, não foi favorável, com sobrevivência de apenas 26,7% e 13,3% com a utilização de telas fotoconversoras vermelha e azul, enquanto que no tratamento controle, sem as telas, foi observado 66,7% de sobrevivência, o que é 2,5 e

5 vezes superior a taxa de sobrevivência das plantas submetidas a aclimatização com uso de telas (FIGURA 4).

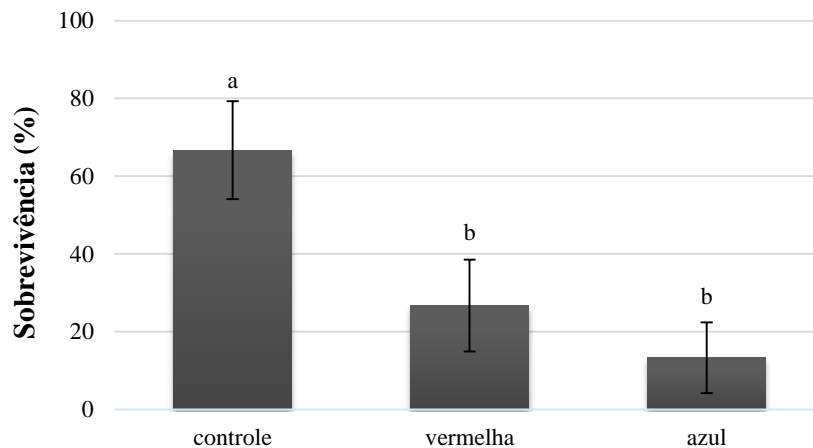


Figura 4: Porcentagem de sobrevivência de plantas de estrelícia durante a aclimatização na ausência (controle) e presença de telas fotoconversoras vermelha e azul. Os dados são expressos como média \pm erros padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Esses resultados podem estar relacionados com a porcentagem de sombreamento das telas utilizadas, a qual pode ter sido elevada para essa cultura estudada. Assim, a baixa intensidade da radiação fotossinteticamente ativa pode ter limitado o desenvolvimento, uma vez que, o mínimo de radiação é necessário para a síntese dos pigmentos fotossintéticos e também para a atividade da cadeia transportadora de elétrons, causando maior perda de plantas (LEE et al., 2005; RODRIGUES et al., 2015). Resultados semelhantes foram observados na aclimatização de *Etilingera elatior* em que melhor porcentagem de sobrevivência também ocorreu sem uso de telas fotoconversoras (RODRIGUES et al., 2015). Além disso, muitas vezes as plantas não podem se desenvolver apenas com luz vermelha ou azul, pois tem sido mostrado que existe um grande sinergismo entre a atividade de receptores desses comprimentos de onda (USAMI et al., 2004). Para algumas espécies quando a luz vermelha é utilizada de forma isolada ocorre declínio da taxa fotossintética e da fluorescência da clorofila (MATSUDA et al., 2004; SAVVIDES; FANOURLAKIS; VAN IEPEREN, 2012). Além disso, já foi relatado que a condutância estomática, taxa fotossintética, fixação de CO₂ e

eficiência do fotossistema II foram promovidas pela combinação de luz azul e vermelha (HOGEWONING et al., 2010; SAVVIDES; FANOOURAKIS; VAN IEPEREN, 2012). Mostrando que esses receptores têm interações que são importantes para a regulação fisiológica (SU et al., 2017), e conseqüentemente apenas um comprimento de onda pode comprometer o bom crescimento da planta, como observado em estrelícia.

4 CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados nesse trabalho provou-se que é possível induzir a formação de brotos *in vitro* em estrelícia utilizando 20 μ M de BAP, mesmo apresentando menor crescimento e maior oxidação.

Para a aclimatização, o uso de telas fotoconversoras tem efeito negativo, ocorrendo maior porcentagem de sobrevivência (66,7%) para plantas aclimatizadas sem as telas.

REFERÊNCIAS

- ABDELMAGEED, A. H. A. et al. Micropropagation of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud explants. **Journal of Medicinal Plants Research**, Ebene v. 5, n. 18, p. 4465-4469, 2011.
- BRAGA, F. T. et al. Qualidade de luz no cultivo in vitro de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, 2009.
- DIAS, M. C. et al. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 117, n. 2, p. 213-224, 2014.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- HOGEWONING, S. W. et al. Blue light dose–responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 11, p. 3107-3117, 2010.
- HUTCHINSON, M. J. et al. Effect of Thidiazuron, NAA and BAP on in vitro Propagation of *Alstroemeria aurantiaca* cv. 'Rosita' from shoot tip explants. **Journal of Agriculture, Science and Technology**, Tehran, v. 16, n. 2, p. 58-72, 2014.
- KELLER, E. R. J. et al., Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germoplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, 2013.
- KLEMŠ, M. et al. Changes in cytokinin levels and metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) explants during in vitro shoot organogenesis induced by trans-zeatin and dihydrozeatin. **Plant Growth Regulation**, Penrith, v. 65, n. 3, p. 427-437, 2011.
- LEE, S. et al. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 90, n. 2, p.141-151, 2007.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreirapreta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.

- MALIK, S. K. et al. Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 4, p.539-553, 2005.
- MATSUDA, Ryo et al. Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 12, p. 1870-1874, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NISLER, J. et al. Novel thidiazuron-derived inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase. **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 235-248, 2016.
- NORTH, J. J et al. Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. **International Journal of Physical Sciences**, Ota, v. 7, n. 4, p. 638-646, 2012.
- OSÓRIO, M. L.; OSÓRIO, J; ROMANO, A. Chlorophyll fluorescence in micropropagated *Rhododendron ponticum* subsp. baeticum plants in response to different irradiances. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 3, p. 415-422, 2010.
- OREN-SHAMIR, M. et al. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p.353-361, 2001.
- OUZOUNIS, T. et al. Predawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa*. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 6, p. 19-33, 2015.
- PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Controle de oxidação no cultivo in vitro de embriões de estrelícia (*Strelitzia reginae*). **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 13, n. 2, 2007.
- PAIVA, P. D. O. et al. Estabelecimento in vitro de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, 2004.
- RODRIGUES, M. et al. Growth and photosynthetic responses during *ex vitro* acclimatization of *Etilingera elatior* (Jack) rm smith (torch ginger). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 4, p. 495-504, 2015.

SAVVIDES, A.; FANOURAKIS, D.; VAN IEPEREN, W. Co-ordination of hydraulic and stomatal conductances across light qualities in cucumber leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 3, p. 1135-1143, 2011.

SILVA, R. A. L. et al. Leaf anatomy of genotypes of banana plant grown under coloured shade nets. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 23, p. 2359-2366, 2014.

SIVANESAN, I. et al. Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai—a rare endemic ornamental plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 1, p. 55-63, 2011.

SU, J. et al. Coordination of cryptochrome and phytochrome signals in the regulation of plant light responses. **Agronomy**, Basel, v. 7, n. 1, p. 25, 2017.

ULISSES, C. et al. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section explants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 11-18, 2010.

USAMI, T. et al. Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate Arabidopsis root greening under blue light. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, n. 45, v. 12, p. 1798-1808, 2004.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Hyperhydricity: a metabolic disorder. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, 2012.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T.. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011.

YUNUS, M. F. et al. In vitro propagation of *Etlingera elatior* (Jack)(torch ginger). **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 135, p. 145-150, 2012.

**ARTIGO 3: ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E ESTABILIDADE GENÉTICA EM
PLANTAS DE ESTRELÍCIA APÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES**

RESUMO

A estrelícia é uma planta ornamental com grande importância econômica, contudo, o mercado de flores e plantas ornamentais é mercado por tendências que variam ao longo das estações e dos anos. Dessa forma, técnicas de conservação, como a criopreservação, podem ser utilizadas para a manutenção de espécies e cultivares, no entanto, é importante conhecer o efeito das baixas temperaturas utilizadas no resfriamento sobre a estabilidade genética e aspectos anatômicos das espécies conservadas. Assim, objetivou-se avaliar a ocorrência de alterações anatômicas e a manutenção da estabilidade genética das plantas regeneradas a partir de embriões zigóticos de estrelícia criopreservados. Após realizada a desidratação de embriões zigóticos por 0, 30 e 60 minutos utilizando sílica-gel, esses foram criopreservados em nitrogênio líquido (+NL). Considerando o tempo de desidratação, o desenvolvimento das plântulas foi melhor em embriões criopreservados após a desidratação por 30 minutos, não ocorrendo diferenças na porcentagem de sobrevivência durante a aclimatização, nem mesmo alterações anatômicas nos tecidos fotossintéticos e mudanças na estabilidade genética das plantas. Assim, conclui-se que é possível fazer a criopreservação de embriões zigóticos de estrelícia, não ocorrendo alterações anatômicas e na estabilidade genética das plantas.

Palavras-chave: *Strelitzia reginae*. Conservação em longo prazo. Aclimatização. Desidratação. Germoplasma. Sílica-gel.

ABSTRACT

Strelitzia is an economic important ornamental plant, however, the market for flowers and ornamental plants is market by trends that vary throughout the seasons and years. Thus, conservation techniques, such as cryopreservation, are used for the maintenance of species and cultivars, however, it is important to know the effect of low temperatures used during the freezing on the genetic stability and anatomical aspects of the conserved species. The objective of this study was to evaluate the occurrence of anatomical alterations and the maintenance of the genetic stability of regenerated plants from cryopreserved zygotic embryos of *strelitzia*. After dehydration of zygotic embryos for 0, 30 and 60 minutes using silica gel, these were cryopreserved in liquid nitrogen (+ NL). Considering the dehydration time, seedling development was better in cryopreserved embryos after dehydration for 30 minutes, with no differences in the percentage of survival during acclimatization, or even anatomical changes in the photosynthetic tissues and changes in the genetic stability of the plants. Therefore, it is concluded that cryopreservation of zygotic embryos of *strelitzia* is possible, without anatomical changes and genetic stability of the plants.

Keywords: *Strelitzia reginae*. Long-term conservation. Acclimatization. Dehydration. Germplasm. Silica gel.

1 INTRODUÇÃO

A manutenção de espécies e cultivares em condições *ex vitro* para produtores e melhoristas é despendiosa e acarreta em riscos por ocorrência de estresses bióticos e abióticos (SEKIZAWA et al., 2011). Assim, a forma recomendada para conservação é o uso de bancos de germoplasma que permite o acesso rápido e eficiente de um grande número de variedades e espécies (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Dentre as ferramentas utilizadas para a conservação, a criopreservação destaca-se por permitir o armazenamento em longo prazo e em pequeno espaço, sendo importante para espécies ameaçadas de extinção e de interesse comercial (KULUS; ZALEWSKA, 2014; PRUDENTE et al., 2016). Essa técnica consiste no armazenamento à temperaturas ultra-baixas, geralmente utilizando nitrogênio líquido (-196 °C), ocorrendo, assim, redução de processos bioquímicos e físicos, o que permite a conservação do material (PANIS; LAMBARDI, 2006; SANTOS; SALOMÃO, 2017). No entanto, o sucesso da criopreservação depende do teor de água no interior dos explantes que está diretamente relacionado à formação de cristais de gelo durante o resfriamento e reaquecimento (SILVA et al., 2014). Dessa forma, a desidratação dos explantes antes do resfriamento torna-se necessária, o que pode ser obtido utilizando sílica-gel. Esse tipo de desidratação física é eficiente para permitir o bom desenvolvimento de muitas espécies após o processo de resfriamento, principalmente quando deseja realizar o armazenamento de sementes ortodoxas, embriões zigóticos e eixos embrionários (KAVIANI, 2010; PINTO et al., 2016).

A criopreservação de embriões zigóticos ou eixos embrionários além de proporcionar a conservação da variabilidade genética de uma determinada espécie em longo prazo permite a conservação de espécies que apresentam dificuldades de germinação devido à dormência ou outros problemas impostos pelas estruturas circundantes (PRITCHARD; BEEBY; DAVIES, 1998). Assim, a criopreservação de embriões zigóticos é uma alternativa para a conservação de estrelícia (*Strelitzia reginae*), uma das plantas ornamentais mais utilizadas em jardins e como flor de corte, que apresenta dormência química e física nas sementes (PAIVA; PAIVA;

PASQUAL, 2007). Além disso, a criopreservação é importante para preservar as espécies e cultivares de interesse comercial, uma vez que, constantemente novas cultivares são produzidas e introduzidas no mercado, o que pode comprometer a produção de algumas espécies utilizadas na atualidade, e que futuramente podem retornar a ter importância econômica (SEKIZAWA et al., 2011), como o caso de estrelícia.

No entanto, é importante que durante o processo de armazenamento em baixas temperaturas, as quais podem causar crioinjúria, não ocorram alterações na estabilidade genética e na anatomia dos tecidos, o que pode prejudicar o potencial de regeneração e aclimatização das plantas (KULUS; ZALEWSKA, 2014; PANIS; LAMBARDI, 2006). Entretanto, ainda não existem relatos de técnicas para criopreservação de estrelícia.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o processo de criopreservação de embriões zigóticos de estrelícia, além de, avaliar as alterações anatômicas e a estabilidade genética das plantas regeneradas e aclimatizadas a partir de embriões zigóticos criopreservados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Sementes maduras de estrelícia com coloração acinzentada foram coletadas de frutos deiscentes, a 21° 45' de latitude Sul e a 45° 00' de longitude Oeste, a uma altitude de 920 m e levadas para o laboratório onde foi realizado o beneficiamento, retirando-se o arilo. Posteriormente, seguindo protocolo adaptado de Paiva et al. (2004), realizou-se a assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar por meio da imersão por 30 segundos em álcool 70% e em seguida em hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos, sendo lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Após a assepsia, os embriões zigóticos foram excisados com auxílio de bisturi. Esses embriões foram desidratados em sílica-gel em câmara de fluxo laminar.

2.2 Criopreservação dos embriões zigóticos

A determinação do teor de água inicial foi feita pelo método padrão de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$. Para isso, embriões zigóticos foram excisados e pesados para a obtenção do peso úmido, e após 24 horas em estufa foi obtido o peso seco. O conteúdo de umidade foi calculado pela fórmula MC% (Conteúdo de umidade) = $[(\text{peso úmido} - \text{peso seco}) \times 100] / \text{peso úmido}$ (PINTO et al., 2016). Para isso foram utilizadas três repetições com 20 embriões cada.

Após a determinação do teor de água inicial foi realizada a desidratação dos embriões zigóticos pelo método físico, utilizando caixas Gerbox[®] (11 x 11 x 3 cm), contendo 160 g de sílica-gel, por diferentes períodos de tempos: 0 (controle, sem desidratação), 30 e 60 minutos. Após a desidratação, foram utilizados 15 embriões zigóticos por tratamento. Para a criopreservação, os embriões zigóticos desidratados em cada período (30 e 60 minutos) e o controle, sem desidratação, foram transferidos para criotubos (2 mL) e imersos em nitrogênio líquido por no mínimo 60 minutos (+NL). Posteriormente, foram submetidos ao descongelamento, colocando os criotubos em banho-maria a 40°C durante 3 minutos.

Após o descongelamento, os embriões foram inoculados em meio de regeneração, constituído de sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 0,4 M de sacarose, $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel[®] e $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de polivinilpirrolidona (PVP) com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, onde permaneceram por 24 horas. Após esse período, os embriões foram inoculados em meio constituído de sais MS suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel[®] acrescido de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de PVP (PAIVA et al., 2004) e $20 \mu\text{M}$ de ácido giberélico (GA_3), pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Para os tratamentos controles, foram utilizados os mesmos períodos de desidratação, mas não passaram pelo processo de criopreservação (-NL), sendo inoculados diretamente no meio para regeneração.

Os embriões foram mantidos por 7 dias no escuro (ULISSES et al., 2010) e então transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por 60 dias. Aos 7 dias após a inoculação foi avaliada a porcentagem de germinação e aos 60 dias foi realizado novamente a avaliação da

porcentagem de embriões zigóticos germinados (%), comprimento da raiz e da parte aérea (cm).

2.3 Aclimatização

Aos 60 dias após a inoculação, as plântulas regeneradas a partir dos embriões zigóticos criopreservados (+LN) e não criopreservados (-LN) foram transferidas para recipientes plásticos de 200 mL contendo substrato comercial Tropstrato[®] e cobertas com sacos plásticos. As plântulas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com irradiância de fótons de $76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Os recipientes permaneceram cobertos com envoltório plástico nos primeiros 30 dias para a manutenção da umidade e, após 45 dias de aclimatização, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência (%) dessas plantas.

2.3.1 Avaliações anatômicas

As amostras para as análises anatômicas foram coletadas após 45 dias de aclimatização. Foram coletadas folhas completamente expandidas, as quais foram armazenadas em álcool 70% (v:v) até a realização dos cortes anatômicos.

Os cortes anatômicos foram realizados nas regiões medianas das folhas, sendo os cortes transversais feitos com auxílio de micrótomo de mesa e os paradérmicos, adaxial e abaxial, à mão livre, utilizando lâminas de aço. Posteriormente, foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio 2,5%, tríplice lavagem em água destilada e foram corados com solução de azul de Alcian a 0,1% e safranina a 0,1% (KRAUS; ARDUIN, 1997). Foram montadas lâminas semipermanentes utilizando água glicerizada 50%, e estas foram seladas com esmalte incolor. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss Scope AX10[®] acoplado à câmera digital e fotomicrografadas em software Axio Vision R.L. 4.8[®], sendo analisada para os cortes paradérmicos a densidade estomática obtida pelo número de estômatos por mm^2 (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), enquanto para os cortes

transversais foram realizadas observações da estrutura do mesofilo, com 9 repetições por tratamento.

2.3.2 Estabilidade genética - análises de citometria de fluxo

A estabilidade genética foi avaliada por meio de citometria de fluxo que permitiu avaliar o conteúdo de DNA e a ploidia de plantas aclimatizadas provenientes de embriões criopreservados (+NL) comparando com os não criopreservados (-NL). Para isso suspensões nucleares de 50 mg de folhas após 45 dias de aclimatização foram preparadas e os núcleos foram liberados das células cortando amostras desse material com lâminas de bisturi em 1,0 mL de tampão de extração de núcleos LB01 (DPOOLEŽEL, BINAROVÁ, LCRETTI, 1989, 1989). A suspensão do núcleo foi inicialmente filtrada em malhas de 50 µm para remover os fragmentos, corada com 25 µL ml⁻¹ de iodeto de propídeo e então as amostras foram analisadas por 4 minutos, sendo que pelo menos 6.000 núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência para a quantificação de DNA. O padrão de referência utilizado foi folha de ervilha (*Pisum sativum* – 9,09 pg). Para as análises foram utilizadas 3 folhas com 5 repetições de cada.

Os histogramas foram obtidos utilizando o citômetro FACS Calibur[®] (Becton Dickinson) e analisados com o programa Cell Quest (DICKINSON, 1998). As quantidades de DNA (pg) das plantas foram obtidas por meio da equação: quantidade de DNA (pg) = (posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 da ervilha) x 9,09.

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com os tratamentos distribuídos em esquema de fatorial 2x3, referentes ao armazenamento em NL [Não criopreservado (-NL) e criopreservados (+NL)] e períodos de desidratação em sílica-gel (0, 30 e 60 minutos). Os dados obtidos foram analisados comparando-se as médias pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade pelo software estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2014).

3 RESULTADOS

3.1 Criopreservação de embriões zigóticos de estrelícia

O teor inicial de água de embriões zigóticos de estrelícia foi de 16,79%. A desidratação em sílica-gel por 30 e 60 minutos resultou na redução do teor de água de aproximadamente 11,38 % e 11,49 %, respectivamente, comparado ao teor inicial.

A germinação dos embriões zigóticos foi avaliada aos 7 e 60 dias após a criopreservação. Não houve interação entre a criopreservação e os tempos de desidratação, mostrando que os tempos de desidratação não influenciaram na germinação após a criopreservação. Observou-se ainda que quando comparadas as médias dos embriões submetidos a criopreservação (+NL) com o controle (-NL), houve diferenças na porcentagem de germinação entre embriões criopreservados tanto aos 7 (63,9 %) como aos 60 dias (66,13 %) quando comparado com os embriões do tratamento controle (79,6 % e 86,4 %) (FIGURA 1).

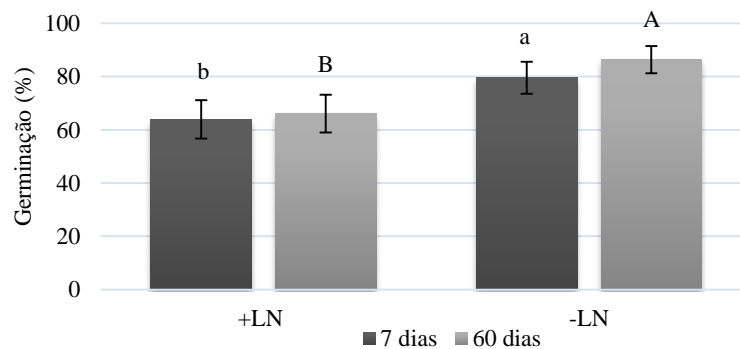


Figura 1: Germinação (%) de embriões zigóticos de estrelícia criopreservados (+LN) e não criopreservados (-LN) aos 7 dias e 60 dias após a inoculação. Os dados são expressos como média \pm erros padrão (barras). Letras minúsculas comparam os dados de germinação após 7 dias e letras maiúsculas após 60 dias.

O desenvolvimento das plântulas após o processo de germinação dos embriões zigóticos foi influenciada pela criopreservação e pelo período de desidratação em sílica-gel, ocorrendo interação entre esses fatores. As análises de comprimento da parte aérea e de raiz demonstraram que para os embriões que não foram criopreservados (-LN) os períodos de desidratação não influenciaram no desenvolvimento da plântula (FIGURA 2). No entanto, em embriões criopreservados em nitrogênio líquido, a desidratação por 30 minutos proporcionou o maior comprimento da parte aérea e das raízes, apresentando 6,77 cm e 3,24 cm, respectivamente (FIGURA 2A e 2B). Ao contrário, com 60 minutos de desidratação houve menor desenvolvimento da parte aérea (2,53 cm) e da raiz (1,66 cm) evidenciando a interação entre o processo de desidratação e a criopreservação (FIGURA 2A e 2B)

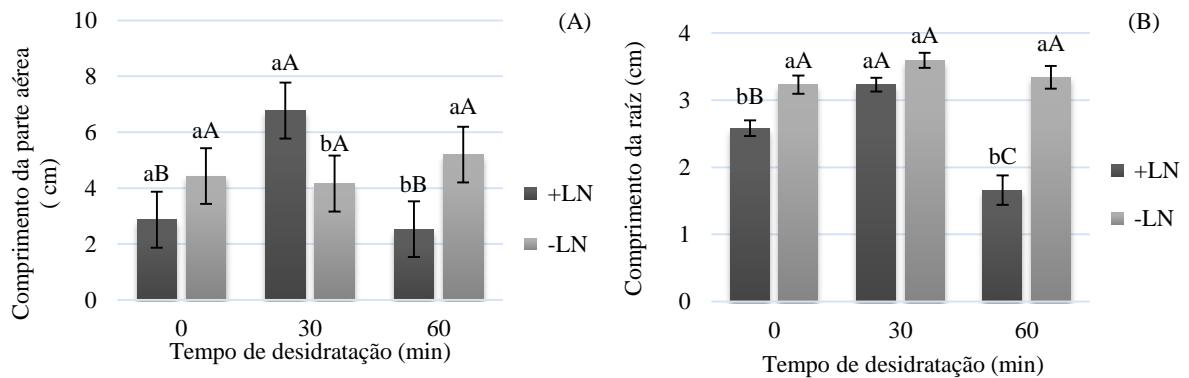








Figura 2: Comprimento da parte aérea (A) e da raiz (B) de plântulas de estrelícia provenientes de embriões zigóticos criopreservados (+LN) e não criopreservados (-LN). Os dados são expressos como média \pm erros padrão (barras). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). Letras minúsculas comparam a criopreservação (-LN;+LN) dentro de cada tempo e maiúsculas comparam os tempos de desidratação dentro de +LN e -LN.

3.2 Aclimatização

A porcentagem de sobrevivência das plantas após o processo de aclimatização, não foi influenciada pelo período de desidratação e pela criopreservação, apresentando média geral de 62% de sobrevivência após 45 dias. Além disso, as plantas obtidas a partir de embriões

criopreservados não apresentaram anormalidades ou sintomas de deficiência nutricional (TABELA 1).

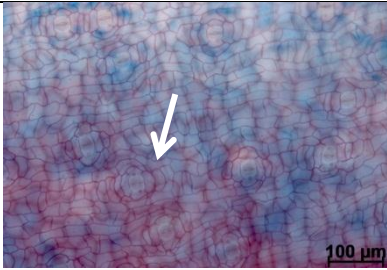
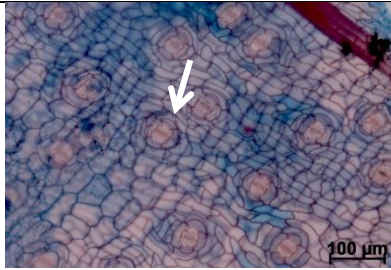
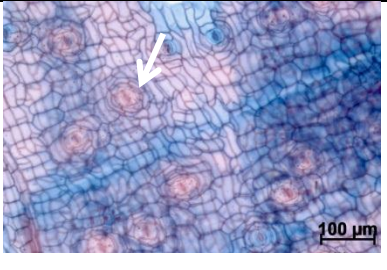
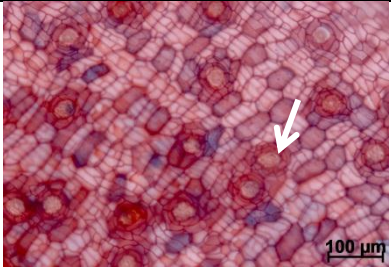
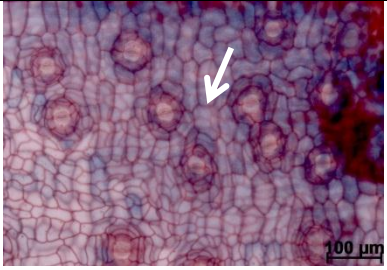
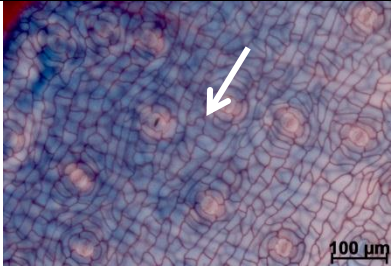
Tabela 1. Aclimatização de plantas provenientes de embriões zigóticos de estrelícia criopreservados (+LN) e não criopreservados (-LN). Barra: 5 cm

Período de desidratação (min)	- LN	+LN
0		
30		
60		

3.2.1 Avaliações anatômicas

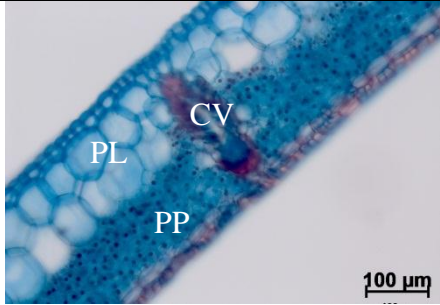
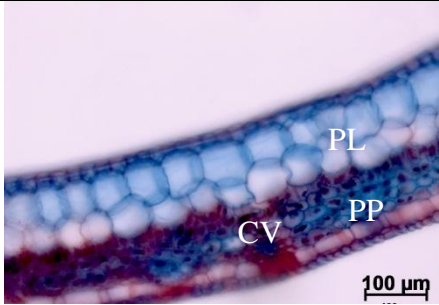
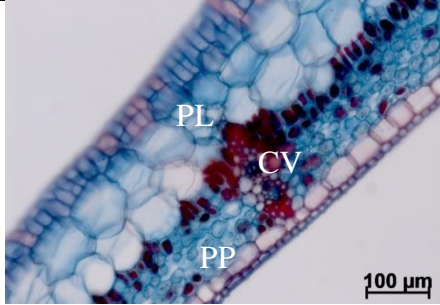
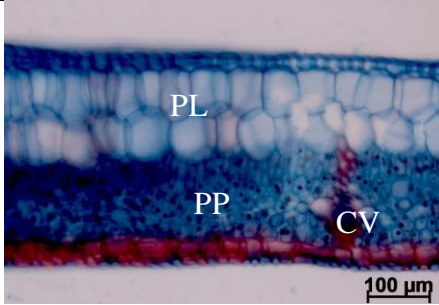
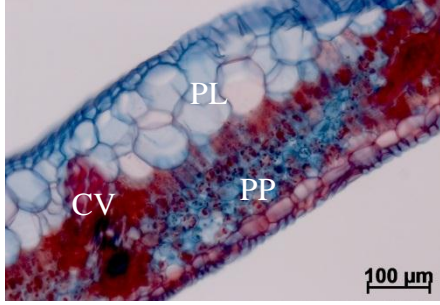
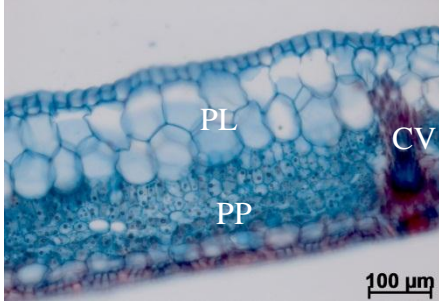
As avaliações anatômicas das plantas regeneradas de embriões criopreservados e não criopreservados (controle) não apresentaram diferenças para o formato dos estômatos, densidade estomática e estrutura do mesófilo. As plantas de estrelicia apresentam estômatos tetracíticos restritos à superfície abaxial, sendo uma folha hipoestomática, com densidade de aproximadamente 34 estômatos (mm^{-2}) (TABELA 2).

Tabela 2. Fotomicrografias de seções paradérmicas da superfície abaxial de folhas de estrelícia após a aclimatização de plantas provenientes de embriões criopreservados (+LN) e não criopreservados (-LN). Setas indicam os estômatos tetracíticos.

Período de desidratação (min)	- LN	+LN
0		
30		
60		

O mesofilo dessas plantas é dorsiventral apresentando uma camada de célula paliádica e duas ou três camadas de células de parênquima lacunoso, sendo um mesofilo bem diferenciado independente dos tratamentos de criopreservação (TABELA 3).

Tabela 3. Fotomicrografias de seções transversais de folhas de estrelícia após a aclimatização de plantas provenientes de embriões criopreservados (+LN) e não criopreservados (-LN). PP (Parênquima paliçádico), PL (Parênquima lacunoso), CV (Cilindro vascular).

Período de desidratação (min)	- LN	+LN
0		
30		
60		

3.2.2 Estabilidade genética

A criopreservação não apresentou efeito sobre a estabilidade genética, não havendo alterações na ploidia de plantas regeneradas a partir de embriões criopreservados e não criopreservados (FIGURA 3).

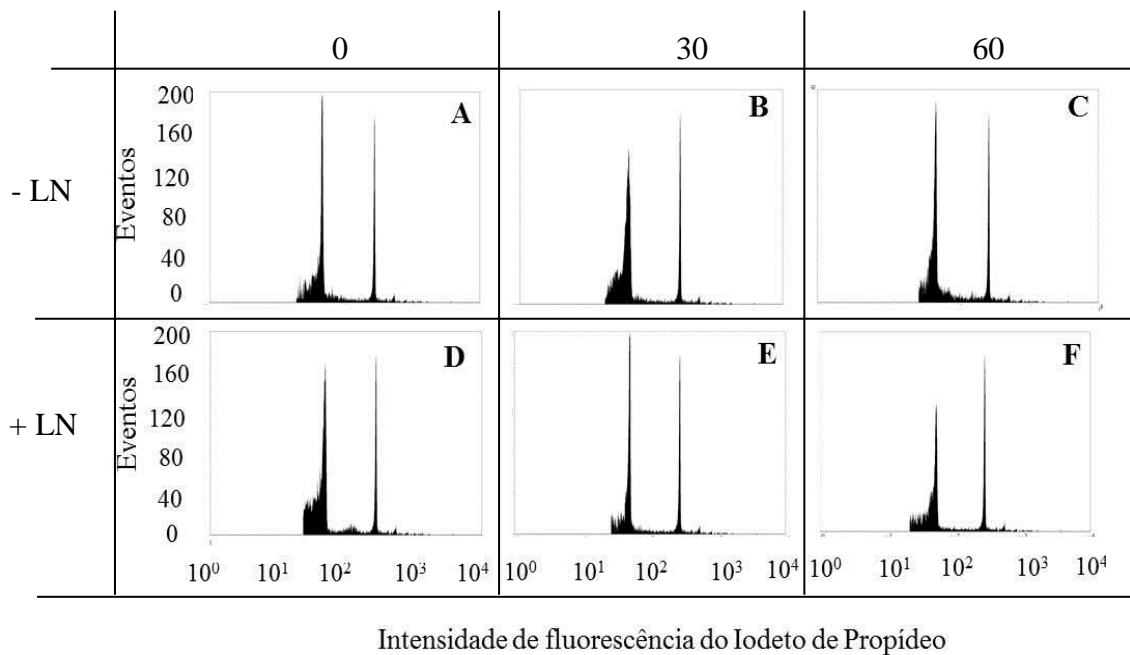


Figura 3: Histogramas da intensidade relativa do iodeto de propídeo usando núcleos de folhas de plantas estrelícia desidratadas por 0, 30 e 60 minutos e criopreservadas (+LN) e não criopreservadas (-LN).

Além disso, não houve diferenças no conteúdo de DNA de plantas provenientes de embriões criopreservados comparado as plantas regeneradas de embriões não criopreservados, apresentando 1,60 pg e 1,65 pg, sendo que o coeficiente de variação para esses resultados foi de 2,70 e 2,59, respectivamente.

4 DISCUSSÃO

Embriões zigóticos estão entre as fontes de explantes utilizadas preferencialmente para criopreservação de espécies, uma vez que, apresentam o máximo de células meristemáticas, de pequeno tamanho, com citoplasma denso, vacúolos pequenos e balanço entre núcleo e citoplasma alto (FIGURA 4A). Conseqüentemente, apresentam menor teor de água quando comparado a outros tipos de explantes, o que favorece o sucesso da criopreservação utilizando a técnica de desidratação em sílica-gel (PANIS; LAMBARDI, 2006; PINTO et al., 2016)

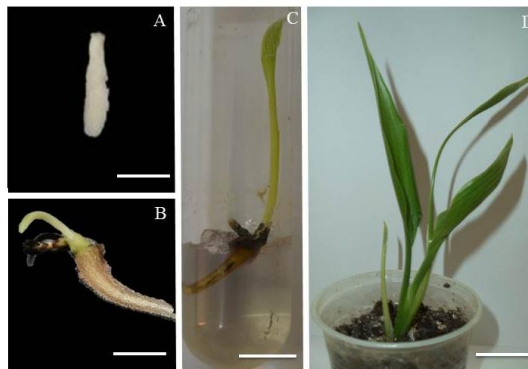


Figura 4: (A) Embriões zigóticos de estrelicia utilizados durante a criopreservação por meio da técnica de desidratação em sílica-gel, (B) e (C) Plântulas normais provenientes de embriões zigóticos de estrelicia criopreservados, (D) Plantas de estrelicia com dois meses após o término da etapa de aclimatização. Comprimento da barra: (A) 0,25 cm (B, C e D) 1,0 cm.

Com relação aos embriões criopreservados (+LN) e não criopreservados (-LN) observou-se que independente do tempo de desidratação em sílica-gel, o armazenamento dos embriões em nitrogênio líquido reduziu a porcentagem de germinação de 86,4 % para 66,1 %. Dessa forma pode-se inferir que a redução da porcentagem de germinação está relacionada ao efeito do resfriamento e não com os tratamentos de desidratação. Entretanto, mesmo com essa redução da germinação os resultados são positivos, pois a taxa de germinação ainda foi relativamente alta (66,1 %).

Além disso, a criopreservação não afetou a regeneração e desenvolvimento de plântulas normais, pois 100% das plântulas apresentaram formação de parte aérea e raízes

(FIGURA 4B e 4C). No entanto, diferenças foram observadas no comprimento da parte aérea e da raiz quando foram analisados a interação entre a criopreservação e os tempos de desidratação.

Plântulas regeneradas a partir de explantes criopreservados podem apresentar melhor desenvolvimento quando é realizada desidratação moderada do explante a ser criopreservado (WEN; WANG, 2010). Assim, plântulas regeneradas a partir de embriões criopreservados apresentaram melhor desenvolvimento da parte aérea (6,77 cm) e da raiz (3,23 cm) quando os embriões foram desidratados por 30 minutos em sílica-gel, enquanto que, plântulas provenientes de embriões que não foram desidratados, tiveram o desenvolvimento comprometido. Esse resultado pode estar associado ao excesso de água e consiguiente formação de cristais de gelo, causando danos aos tecidos meristemáticos, que consequentemente causa danos na germinação e desenvolvimento das plântulas (PANIS; LAMBARDI, 2006).

Todavia, os resultados não seguiram a mesma tendência após a desidratação em sílica-gel por 60 minutos. Esse maior tempo de desidratação acoplado à criopreservação pode ter sido responsável por retardar o desenvolvimento, possivelmente devido a um estresse oxidativo mais elevado. Pois, a combinação desses eventos, bem como, o ciclo resfriamento-reaquecimento podem ocasionar maior produção de espécies reativas de oxigênio ocasionando um desequilíbrio no metabolismo e, consequentemente, comprometer o desenvolvimento e estabelecimento normal das plantas (CHEN et al., 2015; UCHENDU et al., 2010).

A obtenção de plântulas *in vitro* provenientes de embriões criopreservados não é suficiente para afirmar o sucesso do protocolo de criopreservação, pois a etapa de aclimatização é importante por proporcionar a aquisição de mudas preparadas para o cultivo em condições de campo. No entanto, a fase de aclimatização é crítica visto que as plantas cultivadas *in vitro* apresentam características fisiológicas e anatômicas que podem dificultar a transferência para o ambiente *ex vitro* resultando na mortalidade das mudas (DIAS et al., 2014). Adicionalmente, a criopreservação pode causar colapso nos tecidos fotossintéticos comprometendo ainda mais essa fase (GANEVA et al., 2009). Porém, verificou-se que as

plantas obtidas a partir dos embriões de estrelícia criopreservados não apresentaram alterações durante a etapa de aclimatização (FIGURA 4D), sendo mantida a estrutura do mesófilo e da densidade estomática dessas plantas, proporcionando adequado desempenho fotossintético.

Outro aspecto importante para ser analisado após o processo de criopreservação é a estabilidade genética das plantas, pois podem ser causadas crioinjúrias que ocasionam a peroxidação lipídica, a desnaturação de proteínas e mutações no DNA, causando alterações genéticas (GALDIANO et al., 2014; KULUS; ZALEWSKA, 2014). Após a aclimatização, na avaliação das folhas de estrelícia criopreservadas não foram observadas alterações no conteúdo de DNA e na ploidia, assegurando que as plantas apresentam as mesmas características das plantas obtidas de embriões não criopreservados. Assim, a criopreservação utilizando a desidratação de embriões zigóticos em sílica-gel pode ser considerada uma técnica eficiente para o armazenamento em longo prazo de estrelícia.

5 CONCLUSÕES

Embriões zigóticos de estrelícia podem ser criopreservados utilizando a desidratação em sílica-gel por 30 minutos.

As plantas provenientes de embriões criopreservados de estrelícia não apresentam alterações nos seus aspectos anatômicos e na estabilidade genética decorrentes do armazenamento em baixas temperaturas, apresentando resultados satisfatório para desenvolvimento durante o processo de aclimatização.

REFERÊNCIAS

- CASTRO E.M, PEREIRA F.J., PAIVA R. **Histologia vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos**. Lavras: Ed. UFLA, 2009. 234 p.
- CHEN, G. et al. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in Arabidopsis seedlings. **Cryobiology**, San Diego, v. 70, n. 1, p. 38-47, 2015.
- DIAS, M. C. et al. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 117, n. 2, p. 213-224, 2014.
- DICKINSON, B. **Cell quest software: reference manual**. San Jose: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 1998.
- DPOOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LCRETI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 31, n. 2, p. 113-120, 1989.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- GALDIANO, R. F. et al. Seedling development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 175, n. 5, p. 2521-2529, 2014.
- GANEVA, T. et al. Structural responses of the photosynthetic apparatus of *Orthosiphon stamineus* Benth. to temperature stress after cryopreservation. **Botanica Serbica**, Belgrade, v. 33, n. 2, p. 163-167, 2009.
- KAVIANI, B. Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important sermplasm: Seed of Lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioiss.], embryonic axe of Persian Lilac (*Melia azedarach* L.), and Tea (*Camellia sinensis* L.). **Plant Omics**, Queensland, v. 3, n. 6, p. 177, 2010.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Editora Universidade Rural, 1997.
- KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. **Scientia Horticulturae**, British Columbia, v. 168, p. 88-107, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PAIVA, P. D. O. et al. Estabelecimento in vitro de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, 2004.

PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Controle de oxidação no cultivo *in vitro* de embriões de estrelícia (*Strelitzia reginae*). **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 13, n. 2, 2007.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J.; SONNINO, A. **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Rome: FAO, 2006. p. 61-78.

PINTO, M. S. et al. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 4, p. 380-389, 2016.

PRITCHARD, H.W.; BEEBY, L.A.; DAVIES, R.I. The role of embryo culture in the seed conservation of palms and other species. In: RAZDAN, M.K.; COCKING, E.C. **Conservation of genetic resources in vitro**. Ardingley: Royal Botanic Gardens Kew, 1998. p. 89-138.

PRUDENTE, D. O. et al. Cultivo in vitro de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 13-19, 2016.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. *In vitro* germination of zygotic embryos excised from cryopreserved endocarps of queen palm (*Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 53, n. 4, p. 418-424, 2017.

SEKIZAWA, K. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. **Plant Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 401-405, 2011.

SILVA, L. C. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* embryos followed by room temperature thawing. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 36, n. 3, p. 309-315, 2014.

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

ULISSES, C. et al. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section explants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 1, p. 11-18, 2010.

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