

DUANNY THAIS RODRIGUES CAPRONI

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.)  
PEDERSEN E PROPAGAÇÃO *in vitro* DE *Zingiber spectabile* GRIFF. EM  
BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C254c  
2016  
Caproni, Duanny Thais Rodrigues, 1988-  
Criopreservação de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.)  
Pedersen e propagação *in vitro* de *Zingiber spectabile* Griff. em  
biorreatores de imersão temporária / Duanny Thais Rodrigues  
Caproni. – Viçosa, MG, 2016.  
viii, 90f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Gengibre. 2. *Zingiber spectabile*. 3. Criopreservação.  
4. Recursos do germoplasma. 5. Plantas medicinais.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.  
II. Título.

CDD 22 ed. 633.83

DUANNY THAIS RODRIGUES CAPRONI

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.)  
PEDERSEN E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Zingiber Spectabile* GRIFF. EM  
BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de outubro de 2016.



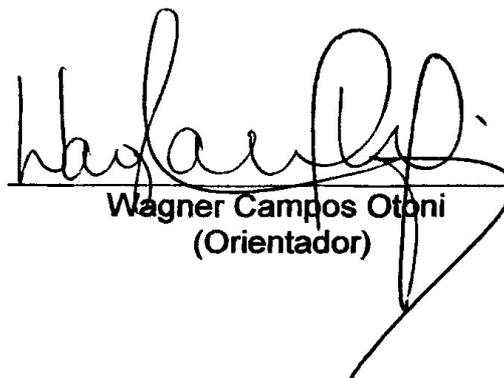
Wellington Marota Barbosa



Ana Claudia Ferreira da Cruz



Elyabe Monteiro de Matos



Wagner Campos Ottoni  
(Orientador)

*Aos meus amados Vô Sérgio e Vó Bibi, pelo amor inquestionável e por me ensinarem a ser uma pessoa íntegra, honesta e a lutar pelos meus objetivos. À minha mãe Veviane, pelo amor, amizade, apoio infinito e por me ajudar a realizar mais esse sonho, eu DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que está comigo em todos os momentos, guiando, protegendo e abençoando todos os meus sonhos.

À toda minha família pelo apoio, incentivo, compreensão e confiança.

À minha mãe Veviane, pelo exemplo, força, fé, apoio e amor incondicional, sem os quais jamais teria atingido essa etapa.

Aos meus irmãos, João Pedro e Davi, pelo apoio e carinho.

Às minhas grandes amigas, Maria Helena e Jane, por estarem sempre comigo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pela orientação, amizade, apoio, confiança, exemplo e por proporcionar a realização de um grande sonho. Serei eternamente grata!

Ao Marcos Vinícius Marques Pinheiro, pela coorientação, apoio, amizade, conselhos e motivação.

À Ana Cláudia Ferreira da Cruz e Anyela Ríos pela amizade, compreensão, apoio nos momentos difíceis e auxílio no Laboratório de Anatomia Vegetal.

Ao professor Wellington Marota, ao Dr. Elyabe Matos e a Dra. Ana Cláudia Ferreira da Cruz, por aceitarem participar como membros da banca examinadora.

Aos meus grandes amigos do LCTII: Sérgio, Diego e Tatiane pelo apoio na escrita, incentivo, auxílio nas dificuldades e muitos momentos divertidos.

Aos colegas do LCTII, pela amizade.

À minha grande amiga, Camila Chagas por todo apoio, conselhos e risadas.

Às minhas queridas amigas de república, pelo convívio. De um modo especial à Vanessa, Bianca e Gabriela, pela amizade sincera e apoio incondicional, sempre.

Aos meus amigos do curso de Fisiologia Vegetal, por momentos únicos e inesquecíveis.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

CAPRONI, Duanny Thais Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2016. **Criopreservação de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e propagação *in vitro* de *Zingiber spectabile* Griff. em biorreatores de imersão temporária.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientador: Marcos Vinícius Marques Pinheiro.

O cultivo de plantas *in vitro* vem sendo amplamente utilizado, proporcionando produção em larga escala de diversas espécies de plantas, como também manutenção de banco de germoplasma, sendo, na maioria das vezes mais vantajoso que a produção e manutenção tradicional. Nesse sentido, a criopreservação é considerada o método mais eficaz e seguro para preservação, em longo prazo, de material biológico, tendo como principal vantagem sua aplicabilidade para diferentes espécies sem a necessidade de subcultivos. Dentre as espécies vegetais com potencial para a criopreservação está a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, a qual apresenta grande interesse para a indústria farmacêutica devido às suas propriedades medicinais. Contudo a obtenção de plantas de *P. glomerata* para uso comercial está sendo realizada de forma indiscriminada e extrativista, podendo causar erosão genética e extinção dentre outros danos. Nesse contexto, esse trabalho vislumbrou o estabelecimento de um protocolo eficiente para criopreservação de genótipos de *P. glomerata*, testando diferentes soluções criogênicas combinadas à aclimatização sob técnicas de cultivo mínimo, adaptando baixas temperaturas combinadas com reguladores de crescimento (ABA e SA) com a finalidade de obter maiores níveis de regeneração de explantes após os processos de criopreservação. Por outro lado, o cultivo de plantas em biorreatores de imersão temporária, tem por finalidade aumentar a produção dos explantes, uma vez que ocorre o contato de curta duração entre o meio de cultura líquido e o explante, renovando o ambiente interno do equipamento e garantindo o fornecimento adequado de nutrientes. Da mesma forma, nesse sistema de cultivo, a utilização de reguladores de crescimento, em especial as citocininas, otimiza protocolos e maximiza a produção de várias espécies de plantas ornamentais. Nesse sentido, *Zingiber spectabile* vem sendo amplamente utilizada como planta ornamental, por ser possuidora de grande beleza, utilizada tanto como flores de corte como também em composições de paisagem. Sob cultivo *in vitro*, essa espécie apresenta elevado potencial de

multiplicação, em especial quando utilizados reguladores de crescimento. Desse modo, o presente trabalho buscou compreender e desenvolver a condição ideal de cultivo em biorreatores de imersão temporária para a espécie utilizando concentrações variáveis de sacarose como também diferentes fontes de citocinina.

## ABSTRACT

CAPRONI, Duanny Thais Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2016. **Cryopreservation of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions and *in vitro* propagation of *zingiber spectabile* Griff. in temporary immersion bioreactors.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Coadviser: Marcos Vinícius Marques Pinheiro.

The *in vitro* cultivation of plants has been widely used, providing large-scale production of several plant species, as well as germplasm maintenance being often more advantageous than traditional production. In this sense, cryopreservation has been considered the most effective and safe method for long-term preservation of biological material, the main advantage of its applicability to different plant without the need of subcultures. Among the plant species with potential for cryopreservation is the *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, which shows great interest to the pharmaceutical industry due to medicinal properties. However, obtaining *P. glomerata* plants for commercial use has been carried out in an indiscriminate and extractivist way, which may lead to genetic erosion and even extinction, among other damages. In this context, this work presents the establishment of an efficient protocol for cryopreservation of *P. glomerata* accessions, evaluating various cryogenic solutions combined with acclimatization under minimum cultivation techniques growth regulators in order to obtain higher level explant regeneration after cryopreservation procedures. On the other hand, the cultivation of plants in a temporary immersion bioreactor, aiming to increase the yield of propagules by means of a quick contact between the liquid culture medium and the explant, renewing the internal culture environment and ensuring adequate supply of nutrients. Likewise, the use of growth regulators, particularly cytokinins, in this culture system has been optimizing protocols and maximizing the production of various species of ornamental plants. In this sense, *Zingiber spectabile* has been widely used as an ornamental plant, because it holds great beauty, both used as cut flowers as well as in scenery compositions. In *in vitro* culture, this species has a high potential for multiplication, especially when growth regulators are used. Thus, this study aim to understand and develop an ideal condition for the cultivation in temporary immersion bioreactors for the species using varying sucrose concentrations as well as different sources of cytokinin.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS .....	7
CAPÍTULO I: Criopreservação de acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen.....	13
Resumo .....	13
Abstract.....	14
1.INTRODUÇÃO .....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
2.1 Material vegetal .....	18
2.2 A propagação fotoautotrófica e fotomixotrófica de <i>Pfaffia glomerata</i> rustificam plantas para suportar temperaturas ultra-baixas de criopreservação?.....	22
2.3 Os genótipos de <i>Pfaffia glomerata</i> suportam diferentemente as condições de temperaturas ultrabaixas gerados processo de criopreservação? .....	24
2.4 Variações nas soluções de saturação e vitrificação auxiliam no processo de criopreservação de segmentos nodais de <i>Pfaffia glomerata</i> ? .....	26
3. RESULTADOS .....	29
3.1 Variações nas concentrações de solução de pré-cultivo, saturação e vitrificação são eficientes para obter plantas criopreservadas de <i>Pfaffia glomerata</i> ? .....	29
3.2 Propagação fotoautotrófica e fotomixotrófica de <i>Pfaffia glomerata</i> rustificam plantas para suportar temperaturas ultrabaixas de criopreservação?.....	29
3.3 Os genótipos de <i>Pfaffia glomerata</i> suportam diferentemente as condições de temperaturas ultrabaixas gerados processo de criopreservação? .....	33
3.4 Variações nas soluções de saturação e crioprotetora auxiliam no processo de criopreservação de segmentos nodais de <i>Pfaffia glomerata</i> ? .....	35
4. DISCUSSÃO.....	38
4.1 Variações nas concentrações de soluções utilizadas no processo de vitrificação foram necessárias para se obter protocolo inicial de criopreservação para <i>Pfaffia glomerata</i> .....	38
4.2 Propagação fotoautotrófica e fotomixotrófica de <i>Pfaffia glomerata</i> não rustificam plantas para suportar temperaturas ultrabaixas de criopreservação ...	40
4.3 Genótipos de <i>Pfaffia glomerata</i> suportam as condições de temperaturas ultrabaixas gerados processo de criopreservação .....	41
4.4 Solução de saturação contendo 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose combinada com solução crioprotetora PVS2 tradicional auxiliam no processo de criopreservação de segmentos nodais de <i>Pfaffia glomerata</i> .....	44
5. REFERÊNCIAS .....	46
CAPÍTULO II: Propagação <i>in vitro</i> de <i>Zingiber spectabile</i> Griff. em biorreatores de imersão temporária .....	53
Resumo.....	53
Abstract.....	54
1.INTRODUÇÃO .....	55
2.MATERIAL E MÉTODOS .....	57
2.1 Material vegetal e condições de cultivo .....	57
2.2 Multiplicação de segmentos nodais de <i>Zingiber spectabile</i> em biorreatores de imersão temporária do tipo RITA® .....	57
2.3 Parâmetros de crescimento.....	57

2.4	Caracterização anatômica, histoquímica e índice estomático das folhas.....	58
2.5	Quantificação de pigmentos fotossintéticos .....	59
2.6	Perfil hormonal .....	59
2.7	Delineamento Experimental .....	60
3.	RESULTADOS .....	61
3.1	Parâmetros de crescimento.....	61
3.2	Análise anatômica, histoquímica e índice estomático das folhas de <i>Zingiber espectabile</i> .....	63
3.3	Quantificação de pigmentos fotossintéticos clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> e carotenoides ...	69
3.4	Perfil hormonal .....	69
4.	DISCUSSÃO .....	75
4.1	Parâmetros de crescimento.....	75
4.2	Características anatômicas .....	76
4.3	Perfil hormonal .....	77
4.4	Correlação de Pearson .....	79
5.	REFERÊNCIAS .....	82
	CONCLUSÕES GERAIS.....	89

## INTRODUÇÃO GERAL

Desde o início da década de 70 há crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos vegetais (Carneiro, 2010). Nesse contexto, diferentes técnicas da cultura de tecidos vegetais vêm sendo amplamente utilizadas, proporcionando produção em larga escala de diversas espécies de plantas, sendo na maioria das vezes, mais vantajosas que a produção tradicional. Bem como, através da cultura de tecidos é possível a manutenção e conservação genética destas plantas em bancos de germoplasmas *in vitro*. Dentre as técnicas utilizadas em diferentes pesquisas, destacam-se a criopreservação e cultivo de plantas em biorreatores.

Atualmente, a criopreservação é considerada o método mais eficaz para preservação em longo prazo de material biológico, tendo como principal vantagem sua aplicabilidade para diferentes espécies vegetais (San José et al., 2015), sem a necessidade de subcultivos e conseqüente risco de contaminação (Engelmann, 2004; Simione, 2013). Além disso, é considerado um método seguro, rápido e menos trabalhoso para a conservação dos recursos genéticos em muitas espécies de plantas, podendo desempenhar também, importante papel na manutenção da biodiversidade e prevenção da erosão genética (Sisunandar et al., 2010; Sen-Rong & Ming-Hua, 2012; Naidoo et al., 2016).

De modo geral, a criopreservação de material biológico é realizada em condições de temperaturas ultra-baixas no nitrogênio líquido (-196°C) (Engelmann, 2004), inibindo totalmente processos metabólicos e divisões celulares, ao mesmo tempo que, mantêm de forma eficaz a integridade celular, podendo, desse modo, serem estocados por tempo indeterminado, tornando-se atrativa, extremamente vantajosa e de baixo custo (Benson, 2008; Whiteley et al., 2016). Por meio dessa técnica é possível evitar certos efeitos prejudiciais de muitos subcultivos como as diversas contaminações por micro-organismos que podem surgir, variação somaclonal, perda de competência embriogênica (Lambardi et al., 2008), perda de característica celular, alterações cromossômicas, divergência de ploidias e modificações na capacidade biossintética celular (Mustafa et al., 2011).

Além disso, técnicas distintas e adaptadas podem ser utilizadas para cada tipo de material vegetal a ser criopreservado, incluindo a criopreservação de protoplastos, suspensões de células, calos, brotos apicais e laterais, sementes, meristemas, embriões somáticos e zigóticos, além de produtos biotecnológicos em culturas direcionadas para produção de metabólitos secundários de interesse econômico e linhagem de células geneticamente modificadas (Reed 2008; Vendrame et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Em procedimentos de criopreservação, a exposição do material vegetal à elevada desidratação atingindo o estado vítreo possibilita que tecidos e órgãos sejam capazes de resistir à exposição à temperaturas ultra-baixas, pois, todos os fatores que influenciam a formação de gelo intracelular estão sendo evitados, permitindo que estruturas meristemáticas permaneçam intactas, assegurando altas taxas de sobrevivência e restabelecimento dos explantes criopreservados (Withers & Engelmann, 1998; Gonzalez-Arno et al., 2008). Entretanto, os crioprotetores como também temperaturas ultra baixas e pressão osmótica elevada podem gerar diferentes tipos de criolesão que por sua vez, podem resultar em estresses fisiológicos e conseqüentemente, em instabilidade genética (Engelmann, 2004; Martín et al., 2011; Zhang et al., 2015; Ferrari et al., 2016).

Desse modo, a disponibilidade e/ou desenvolvimento de protocolos criogênicos confiáveis e eficientes, que produzam elevada porcentagem de recuperação sem causar nenhum dano às características morfológicas e mantendo a integridade genética da espécie é um pré-requisito básico para a manutenção de germoplasma em temperaturas ultra baixas (Suzuki et al., 2008; Khawniam & Te-chato 2012; Gantait et al., 2015). Nesse sentido, alguns autores vêm utilizando técnicas de cultivo mínimo, adaptando baixas temperaturas combinadas com reguladores de crescimento com a finalidade de obter maiores níveis de regeneração de explantes após os processos de criopreservação. Segundo Suzuki et al. (2006) e Lu et al. (2009), o pré tratamento com ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico (SA) combinados com sacarose são essenciais para criopreservar segmentos nodais de diferentes espécies.

Dentre as espécies vegetais com potencial para a criopreservação está a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Essa espécie é popularmente conhecida como fáfia, ginseng brasileiro, paratudo, corango, batata do mato, dentre outros.

Apresenta grande interesse para a indústria farmacêutica devido apresentar propriedades medicinais (Oliveira, 1986; Martins & Nicoloso, 2004; Saldanha et al., 2014), como anabolizante, analgésico, anti-inflamatório, antimutagênico, afrodisíaco, sedativo e tônico muscular, além de contribuir para a diminuição do estresse físico e mental (Fernandes et al., 2005; Festucci-Buselli et al., 2008; Mendes, 2011; Carulo, 2012; Saldanha et al., 2014; Corrêa et al., 2016). Entre os metabólitos produzidos pela *P. glomerata* estão os fitoesteroides, e o fitoecdisteroide o maior grupo já isolado, sendo representado pelo 20-hidroxiecdisona (20E) ou  $\beta$ -ecdisona (Nishimoto et al., 1986).

No Brasil, a obtenção de plantas medicinais para uso fitoterápico ocorre de forma extrativista, com coleta indiscriminada de plantas nativas, podendo causar extinção, erosão genética dentre outros danos (Serra et al., 2011; Morais et al., 2012). O mesmo vem ocorrendo com *P. glomerata*, pois, a produção de suas raízes, utilizadas na farmacologia apresenta elevado potencial para o consumo nos mercados interno e externo (Nascimento et al., 2007; Festucci-Buselli et al., 2008), e com sua exploração altamente extrativista (Figueiredo et al., 2004; Corrêa et al., 2015), resulta na diminuição de diversidade natural, delimitando a conservação da espécie e preservação da biodiversidade (Sarasan et al., 2011), além de diminuir a qualidade da matéria prima e elevar a heterogeneidade do material colhido. Da mesma forma, a exploração insustentável ameaça populações naturais, possibilitando que ocorra erosão genética (Corrêa Júnior, 2006; Sarasan et al., 2011; Corrêa et al., 2015).

Estudos evidenciaram a possibilidade da conservação de *P. glomerata* em banco de germoplasma *in vitro*, de forma viável e eficiente (Kamada et al., 2009; Alves et al., 2010). Da mesma forma, essa espécie possui elevado potencial para cultivo *in vitro* em sistema fotoautotrófico (Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2012; Saldanha et al., 2013; Saldanha et al., 2014; Corrêa et al., 2015). Desse modo, o desenvolvimento de estudos de criopreservação de *P. glomerata* possibilitará a preservação de diferentes acessos por longo prazo evitando possíveis variações morfogenéticas ocasionadas pelos subcultivos.

Em relação ao cultivo de plantas em biorreatores de imersão temporária, a principal finalidade dessa técnica é aumentar a produção de explantes. Semelhantemente, pesquisas utilizando reguladores de crescimento nesse

sistema de produção têm sido estudados para diferentes espécies com o objetivo de otimizar os protocolos e maximizar a produção.

No geral, a técnica de cultura de tecidos vegetais tem evidenciado resultados satisfatórios para produção comercial de várias espécies, obtendo-se mudas com elevada qualidade, livre de pragas e doenças, característica genética uniforme e independência de sazonalidade inerente a cada cultura. A utilização de protocolos que propiciem melhores taxas de multiplicação é fundamental para o bom êxito do estabelecimento *in vitro*, podendo ser variáveis para cada espécie, realizando o balanceamento das concentrações de nutrientes, carboidratos e reguladores de crescimento (Flores et al., 2010).

Os reguladores de crescimento, também conhecidos como fitormônios, são pequenas moléculas orgânicas importantes para o desenvolvimento das plantas. Além de desempenharem papel integral como moléculas de defesa e respostas imunes (Shigenaga & Argueso, 2016). No cultivo *in vitro*, a regeneração de brotos e a multiplicação são afetadas pelo tipo e pela concentração dos fitormônios utilizados, principalmente por citocininas, que agem diretamente na divisão e expansão celular (Aremu et al., 2012).

A seleção da citocinina para o uso em cultura de tecidos é determinada pela sua eficiência na multiplicação dos explantes, desenvolvendo plantas normais e com capacidade de fácil aclimatação. Atualmente, a benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais amplamente utilizada na micropropagação. Contudo, elevadas concentrações desse regulador acarreta em desvantagens como pouco crescimento da parte aérea, variação somaclonal e hiperidricidade. Por outro lado, Dimitrova et al. (2016) descreveram alguns resultados que indicam que a utilização de metatopolina (m-Top) poderia gerar impactos positivos na micropropagação de plantas.

Da mesma forma, a metodologia tradicional de cultivo *in vitro*, baseia-se em cultivos e subcultivos em frascos, com baixo número de plântulas por frasco (Teixeira, 2002). Nesse caso, o uso de meio de cultura líquido é considerado a solução ideal para a micropropagação (Etienne & Berthouly, 2002; Aragón et al., 2014). No sistema de imersão temporária, ocorre o contato de curta duração entre o meio de cultura líquido e o explante, renovando o ambiente interno do equipamento e garantindo o fornecimento adequado de nutrientes. Nesse sentido,

o maior contato das plantas com o meio de cultura aumenta consideravelmente a absorção, uma vez que esses nutrientes tem a possibilidade de serem absorvidos pela epiderme foliar, caules, raízes e estômatos (Etienne & Berthouly, 2002; Quiala et al., 2012; Vidal et al., 2015).

Para plantas ornamentais, Rodrigues et al. (2006), demonstraram resultados satisfatórios nas taxas de multiplicação de *Heliconia champneiana* Griggs cv. Splash por biorreatores RITA<sup>®</sup>. Da mesma forma, Saare-Surminki et al. (2008) obtiveram sucesso na micropropagação de um híbrido ornanental de *Gentiana scabra* por biorreatores RITA<sup>®</sup>, e Ruffoni & Savona (2005) relataram sucesso ao cultivarem em biorreatores RITA<sup>®</sup> duas espécies, *Zantedeschia aethiopica* e *Anthurium andraeanum*.

Os biorreatores de imersão temporária- RITA<sup>®</sup> possuem um sistema de transferência de meio líquido, ficando em contato com os explantes por período pré-determinado e sem a necessidade de renovação de nutrientes (Ramos-Castellá et al., 2014). Esse sistema tem sido classificado como o mais eficiente, sendo considerada uma alternativa para otimização dos processos de multiplicação *in vitro*, aumentando as taxas de multiplicação das plantas, reduzindo a manipulação das culturas, diminuindo os custos de produção (Ramírez- Mosqueda & Iglecias- Abreu, 2016; Gomes et al., 2016). Assim, o desenvolvimento de pesquisas que avaliem a produção de plantas ornamentais em biorreatores e diferentes fontes de citoninas podem subsidiar informações para aumentar a produção dessas plantas em quantidade e com qualidade.

Atualmente, produção mundial de ornamentais é dominada pela Europa, China e Estados Unidos (Lecomte et al., 2016). O cultivo de plantas ornamentais vem ocasionando importante impacto na indústria hortícola. Geralmente, essas plantas são utilizadas em jardinagem, paisagismo ou como flores de corte. Esse ramo do agronegócio vem movimentando mais de 300 milhões de dólares ao ano (Azadi et al., 2016), devido principalmente, pela busca constante de novos produtos por parte dos consumidores, levando ao aumento da demanda mundial (Lecomte et al., 2016).

A denominação “plantas ornamentais” inclui todas as plantas utilizadas para fins decorativos, para uso em ambientes externo ou interno, podendo ser cultivadas em campo, casas de vegetação ou *in vitro*. Plantas ornamentais se

caracterizam por apresentar grande beleza e formas exóticas, sendo mais comuns as pertencentes às famílias Araceae, Bromeliaceae, Heliconiaceae, Musaceae, Orchidaceae, Zingiberaceae, entre outras, as quais são utilizadas, principalmente em jardins e arranjos florais (Leme & Honório, 2004; França et al., 2010).

*Zingiber spectabile*, pertencente à família das Zingiberaceae, é conhecida popularmente como gengibre ornamental, xampu, maracá, cotonete de elefante e sorvetão. É uma espécie nativa da Malásia e considerada como planta de porte ornamental por ser uma possuidora de grande beleza, utilizada tanto como flores de corte como também em composições de paisagem. Na micropropagação, a espécie apresenta elevado potencial de multiplicação, em especial quando utilizados reguladores de crescimento (Nery et al., 2015). Sivasothy et al. (2012), afirmam que folhas de *Zingiber spectabile* são utilizadas para acentuar o sabor dos alimentos e os rizomas utilizados para redução de inflamações, atuando como germicida, estimulante, tônico, tratamento de câncer e antioxidante, graças à presença de vários flavonóides e sesquiterpenóides.

Considerando todos os aspectos apresentados anteriormente para *Pfaffia glomerata* e *Zingiber spectabile*, observa-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre essas espécies. Com esse trabalho pretendeu-se gerar conhecimento à cerca de técnicas de criopreservação de genótipos de *Pfaffia glomerata*, obtendo plantas regeneradas a partir de técnicas de vitrificação. Além disso, busca-se compreender qual melhor condição de cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA® para a espécie ornamental *Zingiber spectabile*, utilizando concentrações variáveis de sacarose como também diferentes fontes de citocinina.

Diante do exposto, a dissertação foi organizada em dois capítulos redigidos em forma de artigos científicos, sendo eles:

Capítulo I: Criopreservação de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.

Capítulo II: Propagação *in vitro* de *Zingiber spectabile* Griff. em biorreatores de imersão temporária.

## REFERÊNCIAS

ALVES, R.B.N.; BERTONI, B.W.; VIEIRA, R.F.; FRANÇA, S.C.; MING, L.C.; PEREIRA, AM.S. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 12: 510-515, 2010.

ARAGÓN, C. E.; SÁNCHEZ, C.; GONZALEZ-OLMEDO, J.; ESCALONA, M.; CARVALHO L.; AMÂNCIO, S. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. **Biologia Plantarum**, 58: 29–38, 2014.

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 108:1–16, 2012.

AZADI, P.; BAGHERI, H.; NALOUSHI, A. M.; NAZARI, F.; CHANDLER, S. F. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. **Biotechnology Advances**, 34: 1073- 1090, 2016.

BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 27: 141- 219, 2008.

CARNEIRO, M. Manual de Curadores de Germoplasma- Vegetal: Conservação *in vitro*. Documentos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 318, 11p. 2010.

CARULO, M. F. Use of SFC in extraction of adaptogens from Brazilian plants. **American Journal of Analytical Chemistry**, 3:977–982, 2012.

CORRÊA JÚNIOR, C.; CORTEZ, D. A. G.; MING, L. C.; SOARES, W. **Fáfia o ‘ginseng’ brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen]: aspectos agronômicos e fitoquímicos**. Curitiba: Clichetec, 2006, 22p.

CORRÊA, J. P. O.; VITAL, C. E.; PINHEIRO, M. V. M.; BATISTA, D. S.; SALDANHA, C. W.; CRUZ, A. C. F.; NOTINI, M. M.; FREITAS, D. M. S.; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, *in vitro* photoautotrophic growth, and *ex vitro* biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 52: 45-55, 2016.

CORRÊA, J. P.O.; VITAL, C. E.; PINHEIRO, M. V. M.; BATISTA, D. S.; AZEVEDO, J. F. L.; SALDANHA, C. W.; CRUZ, A. C. F.; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 120: 289 - 300, 2015.

DIMITROVA, N.; NACHEVA, L.; BERVORA, M. Effect of *meta*-topolin on the shoot multiplication of pear rootstock ohf-333 (*Pyrus communis* L.) **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, 15: 43-53, 2016.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 40: 427–433, 2004.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69: 215–231, 2002.

FERNANDES, J. F. O.; BRITO, L. C.; FRYDMAN, J. N. G.; SANTOS-FILHO, S. D.; BERNARDO-FILHO, M. An aqueous extract of *Pfaffia* sp. does not alter the labeling of blood constituents with technetium- 99m and the morphology of the red blood cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15: 126– 132, 2005.

FERRARI, E. A. P.; COLOMBO, R. C.; FARIA, R. T.; TAKANE, R. J. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex *Schultes f.* by the vitrification method. **Revista Ciência Agrônômica**, 47: 172- 177, 2016.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CONTIM, L. A. S.; BARBOSA, L. C. A.; STUART, J. J.; OTONI, W. C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone— a review. **Botany** 86: 978 – 987, 2008.

FIGUEIREDO, L. S.; TEIXEIRA, S. L.; FREITAS, S. P.; VIEIRA, I. J. C.; MARTINS, E. R. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes- RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7: 67–72, 2004.

FLORES, R.; BRONDANI JÚNIOR, D.; CEZAROTTO JUNIOR, V.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. T. Micropropagation and  $\beta$ -ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 46: 210–217, 2010.

FRANÇA, C. A. M.; SOUZA, M. P.; PEDROSO, E. A.; SILVA, T. N.; SOUZA FILHO, T. A. Flores e Folhagens Tropicais: Mercado em Expansão. **V Encontro Nacional da Anppas**, 2010.

GANTAIT, S.; SINNIH, U. R.; SURANTHRAN, P.; PALANYANDY, S. R.; SUBRAMANIAM, S. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. **Protoplasma**, 252: 89 – 101, 2015.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, 89: 244–249, 2016.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROC, A. W. M.; ROOSEVELT, H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation

techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92: 1– 13, 2008.

IAREMA, L.; CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110: 227 – 238, 2012.

KAMADA, T.; PICOLI, E.A.T.; VIEIRA, R.F.; BARBOSA, L.C.A.; CRUZ, C.D.; OTONI, W.C. Variação de caracteres morfológicos e fisiológicos de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e correlação com a produção de beta-ecdisona. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 11: 247-259, 2009.

KHAWNIAM, T.; TE-CHATO, S. Cryopreservation of embryogenic callus of hybrid tenera oil palm by dehydration technique and evaluation of somaclonal variation by SSR marker. **International Journal of Agricultural Technology**, 8: 2115 – 2125, 2012.

LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A.; BENELLI, C. Cryopreservation of embryogenic cultures. In: Reed, B.M. **Plant cryopreservation—a practical guide**. Springer Science and Business Media, New York, 2008. P. 177–210.

LECOMTE, C.; ALABOUVETTE, C.; EDEL-HERMANN, V.; ROBERT, F.; STEINBERG, C. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. **Biological Control**, 101: 17-30, 2016.

LEME, J.M.; HONÓRIO, S.L. Padronização e qualidade de antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, 10: 48-50, 2004.

LU, Z. W.; POPOVA, E. V.; WU, C. H.; LEE, E. J.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Cryopreservation of *Ginkgo biloba* cell culture: effect of pretreatment with sucrose and ABA. **CryoLetters**, 30: 232– 243, 2009.

MARTÍN, C.; CERVERA, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO M. E. Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation–dehydration cryopreservation protocol. **Journal of Plant Physiology**, 168: 158-166, 2011.

MARTINS, C. F.; NICOLOSO, F. T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 3:53-61, 2004.

MENDES, F. R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 21:754 – 763, 2011.

MORAIS, T. P.; LUZ, J .M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14: 110 -121, 2012.

MUSTAFA, N. R.; DE WINTER, W.; VAN IREN, F.; VERPOORTE, R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. **Nature Protocols**, 6: 715– 742, 2011.

NAIDOO, C.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; VARGHESE, B. The role of reactive oxygen species and antioxidants during precooling stages of axis cryopreservation in recalcitrant *Trichilia dregeana*. **Botany**, 94: 39- 403, 2016.

NASCIMENTO, E. X.; MOTA, J. H.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. **Ciência e Agrotecnologia**, 31: 742 – 730, 2007.

NERY, F. C.; GOULART, V. L. A.; PAIVA, P. D. O.; REIS, M. V.; SILVA, L. C.; PRUDENTE, D. O.; NERY, M. C.; ALMEIDA, E. F. A. Micropropagation and chemical composition of *Zingiber spectabile* callus. **Acta Horticulturae**, 1083: 197-204, 2015.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, N.; INOUE, S. S. Ecdysterone from *Pfaffia tuberosa* (Sprengel.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1: 188-191, 1986.

OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze - O ginseng brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 1: 86-92, 1986.

QUIALA, E.; CAÑAL, M. J.; MEIJÓN, M.; RODRIGUEZ, R.; CHÁVEZ, M.; VALLEDOR, L.; FERIA, M.; BARBÓN, R. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109: 223–34, 2012.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A., IGLESIAS-ANDREU, L. G. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 52: 154–160, 2016.

RAMOS-CASTELLÁ, A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BELLO-BELLO, J.; LEE-ESPINOSA, H. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 50: 576–81, 2014.

REED, B. M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer ,New York. (2008).

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagação de mudas de helicônia em biorrator de imersão temporária. **Bragantia**, 65: 29- 35, 2006.

RUFFONI, B.; SAVONA, M. The temporary immersion system (t. i. s.) for the improvement of micropropagation of ornamental plants. **Acta Horticulturae**, 693: 445-454, 2005.

SAARE-SURMINSKI, K.; PISOWOTZKI, C.; LIEBEREI, R. Shoor propagation of ornamental gentian in a temporary immersion system – effect os culture

parameters on plant quality. **Propagation of Ornamental Plants**, 8: 210-214, 2008.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L.; DIAS, L. L. C.; RÉGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110: 413– 422, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; CRUZ, A. C. F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 49: 433– 444, 2013.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D. I.; CAVETTE, P. C.; DETMANN, K. S. C.; TANAKA, F. A. O.; DIAS, L. L. C.; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 118: 87 – 99, 2014.

SAN JOSÉ, M. C.; CORREDOIRA, E.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C. Cryopreservation of somatic embryos of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and confirmation of ploidy stability by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 123: 1-11, 2015.

SARASAN, V.; KITE, G. C.; SILESHI, G. W.; STEVENSON, P. C. Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. **Plant Cell Reports**, 30: 1163 – 1172, 2011.

SEN-RONG, H.; MING-HUA, Y. A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109: 287-296, 2012.

SERRA, A. P.; MARCHETTI, M. E.; VIEIRA, M. C.; SILVA, M. A. G.; ROSA JUNIOR, E. J.; NASCIMENTO, J. M.; GUEDES, E. M. S. Produção de biomassa e absorção de N e P pela *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função de doses de N e P em condições de casa de vegetação, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13: 265 – 270, 2011.

SHIGENAGA, A. M.; ARGUESO, C. T. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 56: 174- 189, 2016.

SIMIONE, F. P. **Thermo Scientific Nalgene and Nuc Cryopreservation Guide**. Disponível em : <  
www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation\_Technical\_Manual.ashx> (2009).  
Acesso em: 17 de abril de 2016.

SISUNANDAR, S.; RIVAL, A.; TURQUAY, P.; SAMOSIR, Y.; ADKINS, S. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. **Planta**, 232: 435 – 447, 2010.

SIVASOTHY, Y.; HADI, H. A.; MOHAMAD, K.; LEONG, K. H.; IBRAHIN, H.; SULAIMAN, S. F.; OOI, K. L.; AWANG, K. Spectraflavoside A, a new potent iron chelating dimeric flavonol glycoside from the rhizomes of *Zingiber spectabile* Griff. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22: 31-26, 2012.

SUZUKI, M.; ISHIKAWA, M.; OKUDA, H.; NODA, K.; KISHIMOTO, T.; NAKAMURA, T.; OGIWARA, I.; SHIMURA, I.; AKIHAMA, T. Physiological changes in gentian axillary buds during two-step preculturing with sucrose that conferred high levels of tolerance to desiccation and cryopreservation. **Annals of Botany**, 97: 1073–1081, 2006.

SUZUKI, M.; TANDON P.; ISHIKAWA M.; TOYOMASU T. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. **Plant Biotechnology**, 2: 123-131, 2008.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. **Biociência**, 24:36-41, 2002.

VENDRAME, W.; FARIA, R, T.; SORACE, M.; SAHYUN, S. A. Review orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, 3: 213– 229, 2014.

VIDAL, N.; BLANCO, B.; CUENCA, B. A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 123: 229-243, 2015.

WHITELEY, S. E.; BUNN, E.; MANCERA, R. L.; TUMER, S. R. *Ex situ* conservation of the endangered species *Androcalva perlaria* (Malvaceae) by micropropagation and cryopreservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 125: 341– 352, 2016.

WITHERS, L. A., ENGELMANN, F. In vitro conservation of plant genetic resources. In.: ALTMAN, A., COLWELL, R. R. **Agricultural biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 57-88.

ZHANG, J.; HUANG, B.; ZHANG, X. N.; VOLK, G. M.; ZHOU, Y. C.; CHEN, X. L. Identification of a highly successful cryopreservation method (droplet-vitrification) for petunia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 51: 445 – 451, 2015.

## CAPÍTULO I:

### **Criopreservação de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**

**Resumo-** *Pfaffia glomerata*, conhecida como ginseng brasileiro é considerada uma espécie de grande interesse para a indústria farmacêutica devido à produção do metabólito  $\beta$ -ecdisona. No Brasil, a obtenção de plantas medicinais para uso fitoterápico ocorre de forma extrativista, podendo causar extinção e erosão genética. Do mesmo modo, o cultivo *in vitro* de material vegetal em condições assépticas e controladas vem sendo amplamente utilizado para manutenção de bancos de germoplasma. A utilização do cultivo mínimo demonstra elevada eficiência potencial para conservação de recursos genéticos. A criopreservação vem sendo considerada um método seguro para a conservação em muitas espécies de plantas, e a utilização de técnicas de cultivo mínimo associada à criopreservação possibilita maior taxa de regeneração de explantes criopreservados. O objetivo desse trabalho foi aclimatar genótipos de *Pfaffia glomerata* para obtenção de elevada taxa de regeneração de explantes criopreservados. Para o estabelecimento do protocolo inicial, foram utilizados segmentos nodais de *P. glomerata* sendo cultivados em meio MS e tratados sob diferentes soluções de criogênicas. Para aclimatização, foram utilizados quatro genótipos de *P. glomerata*, sendo estes submetidos à condição fotomixotrófica associado com dois reguladores de crescimento (ABA e SA). Posteriormente os explantes foram tratados com solução de pré-cultivo pré-determinada, solução de saturação, solução crioprotetora (PVS2) e introduzidos em nitrogênio líquido. Para variação na composição das soluções de saturação e crioprotetora, foram utilizados segmentos nodais sendo cultivados em meio MS, tratados com solução de pré-cultivo pré-determinada e duas composições de solução de saturação e solução crioprotetora com posterior introdução em nitrogênio líquido. Foi possível recuperar explantes criopreservados utilizando solução de saturação composta por glicerol (2 M) + sacarose (0,4 M), por 20 minutos e solução crioprotetora PVS2. As condições de aclimatização foram eficientes para regeneração dos quatro genótipos de *P. glomerata*. Contudo, melhorias nas condições de recuperação dos explantes criopreservados devem ser realizadas.

**Palavras-chave:** banco de germoplasma, aclimação, plantas medicinais.

## CHAPTER I

### **Cryopreservation of access the *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**

**Abstract-** *Pfaffia glomerata*, known as Brazilian ginseng has been considered a species of great interest to the pharmaceutical industry due to the production of  $\beta$ -ecdysone metabolite. In Brazil, the obtaining of medicinal plants for herbal use is in an extractive way and may cause extinction and genetic erosion. Similarly, plant *in vitro* culture under aseptic and controlled conditions has been widely used for the maintenance of germplasm banks. The use of minimum cultivation shows high potential efficiency for conservation of genetic resources. Likewise, cryopreservation has been considered a safe method for the conservation of many plant species and the use of minimum cultivation techniques associated with cryopreservation allows for greater cryopreserved explants regeneration rate. The objective of this study was to acclimatize *Pfaffia glomerata* genotypes to obtain high regeneration rate of cryopreserved explants. For the establishment of the initial protocol, nodal segments of *P. glomerata* with (~1.5 cm) were cultured in MS medium and treated under different cryogenic solutions. For acclimatization, four genotypes of *P. glomerata* were used, being submitted to photomixotrophic condition associated with two growth regulators (ABA and SA), later the explants were treated with predetermined preculture solution, saturated solution, solution cryoprotectant (PVS2) and placed in liquid nitrogen. To change the composition of saturated and cryoprotectant solutions, nodal segments (~1.5 cm) and cultured in MS medium treated with pre-determined preculture solution and two saturation solution compositions and cryoprotectant solution with subsequent introduction of liquid nitrogen. It was possible to recover explants cryopreserved using saturation solution composed of glycerol (2M) + sucrose (0.4 M) for 20 minutes and PVS2 cryoprotectant solution. The acclimatization conditions were effective for regeneration of the four *P. glomerata* genotypes. However, improvements in the cryopreserved explants recovery conditions must be carried out.

**Keywords:** germplasm bank, acclimatization, medicinal plants.

## 1. INTRODUÇÃO

*Pfaffia glomerata*, conhecida como fáfia ou ginseng brasileiro, é uma planta de grande interesse para a indústria farmacêutica devido à produção do metabólito  $\beta$ -ecdisona ou 20-hidroxiecdisona (20E), apresentando elevado potencial para consumo nos mercados interno e externo (Nascimento et al., 2007; Festucci-Buselliet al., 2008). A espécie produz e acumula fitoesteroides, como o estigmasterol, sitosterol, alantoína, ecdisteroides, triterpenoides e nortriterpenoides. Fitoecdisteroide é o maior grupo isolado de fáfia, e o  $\beta$ -ecdisona ou 20-hidroxiecdisona (20E) é o mais encontrado no gênero (Bakrim et al., 2008). Esses compostos apresentam utilidade agroquímica, biotecnológica medicinal e farmacêutica e estão envolvidos em processos bioquímicos e fisiológicos de plantas (Festucci-Buselli et al., 2008). Da mesma forma, houve relatos que atue na defesa de plantas contra insetos fitófagos (Dinan et al., 1998; Festucci-Buselli et al., 2008; Rharrabe et al., 2009).

No Brasil, a obtenção de plantas medicinais para uso fitoterápico vem ocorrendo de forma extrativista, podendo causar extinção de inúmeras espécies de plantas (Serra et al., 2011). O mesmo vem ocorrendo com *Pfaffia glomerata*, na qual sua exploração ocorre de forma altamente extrativista, resultando em diminuição de diversidade natural como também em erosão genética (Sarasan et al., 2011; Morais et al., 2012).

Dessa forma, a propagação *in vitro* torna-se alternativa promissora para propagar genótipos de *Pfaffia glomerata*, fornecendo material vegetal homogêneo, de alta qualidade e livre de doenças em curto período de tempo (Mosaleeyanon et al., 2004; Flores et al., 2010). Semelhantemente, estudos evidenciaram que *Pfaffia glomerata* possui relevante potencial no cultivo *in vitro*, apresentando crescimento satisfatório em sistema fotoautotrófico. Esse sistema é induzido pela exclusão de carboidratos do meio de cultura, aumentando as trocas gasosas entre o ambiente e o interior do frasco. Tal indução ocorre mediante a modificação da composição do meio de cultura, como também a utilização de tampas com membranas (Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2012; Saldanha et al., 2013; Saldanha et al., 2014; Corrêa et al., 2015). Neste sistema, as condições

de cultivo estão mais próximas ao sistema natural, levando à rustificação das plantas ainda em condições *in vitro* (Kozai 2001, 2010; Xiao et al., 2011).

Do mesmo modo, o cultivo *in vitro* de material vegetal em condições assépticas e controladas vem sendo amplamente utilizado para manutenção de bancos de germoplasma. Dentre as técnicas de conservação, há o cultivo mínimo, o qual é realizado com o balanço de reguladores de crescimento e temperatura local, demonstrando assim, alta eficiência e elevado potencial para conservação de recursos genéticos (Mosaleeyanon et al., 2004). Da mesma forma, há a criopreservação, sendo considerada método seguro, rápido e menos trabalhoso para a conservação dos recursos genéticos em muitas espécies de plantas, podendo desempenhar importante papel na manutenção da biodiversidade e prevenção da erosão genética (Sisunandar et al., 2010; Sen-Rong & Ming-Hua, 2012).

A criopreservação é conceituada como método mais eficaz para preservação em longo prazo de material biológico, tendo como principal vantagem sua aplicabilidade em vasta gama de genótipos (San José et al., 2015), sendo considerada excelente alternativa para conservação de material biológico, pois estes podem ser armazenados por longo período em nitrogênio líquido. Este tempo de conservação prolongado ocorre, na sua maioria, devido à paralização da divisão celular e dos processos metabólicos, o que viabiliza os bancos de germoplasma de recursos genéticos de diversas espécies de interesse (Gonzalez-Arno et al., 2008; Engelmann, 2011).

Em procedimentos de criopreservação, a exposição do material vegetal a condições extremas como por exemplo, temperaturas ultra baixas, pressão osmótica elevada e desidratação, podem resultar em estresses fisiológicos e conseqüentemente, em instabilidade genética (Martín et al., 2011). Desse modo, a disponibilidade ou o desenvolvimento de protocolos de criopreservação confiáveis e eficientes, que produzam elevada porcentagem de recuperação é um pré-requisito básico para a manutenção de espécies em temperaturas ultrabaixas (Suzuki et al., 2008; Hong & Yin, 2009).

Da mesma forma, alguns autores vêm utilizando técnicas de cultivo mínimo, adaptando baixas temperaturas combinadas com reguladores de crescimento com a finalidade de obter maiores níveis de regeneração de

explantes após os processos de criopreservação. Interessantemente, pré-tratamentos com ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico (SA), combinados com sacarose, são essenciais para criopreservar segmentos nodais de uma gama de espécies (Suzuki et al., 2006; Dong et al., 2014).

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi aclimatar genótipos de *Pfaffia glomerata* sob condições fotoautotróficas, fotomixotróficas e cultivo mínimo para obtenção de elevada taxa de regeneração de explantes criopreservados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Como material vegetal foram utilizados segmentos nodais do acesso 4 pertencente ao banco de germoplasma de *Pfaffia glomerata*, do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais- BIOAGRO/UFV, sendo subcultivados, a cada 30 dias em meio de cultura constituído por sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, gelificado com 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck®, Alemanha). O pH do meio ajustado a 5,7 antes da autoclavagem, a 121 °C durante 15 minutos. As culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C sob irradiância de 41 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

Para a realização dos procedimentos de criopreservação foram utilizadas algumas soluções criogênicas, descritas no Box 1.

#### **Box 1. Descrição de Soluções Utilizadas no Processo de Criopreservação**

- 1. Solução de pré-cultivo 1:** Meio MS líquido acrescido de diferentes soluções de sacarose (0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 M);
- 2. Solução de pré-cultivo 2:** Meio MS líquido acrescido de diferentes concentrações de sacarose (0,75; 1,0; M);
- 3. Solução de Saturação 1:** glicerol (2 M) + sacarose (0,4 M);
- 4. Solução de saturação 2:** glicerol (2 M) + sacarose (1 M);
- 5. PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*) 1:** glicerol (30%), etileno glicol (15%), DMSO (15%), meio MS ½ força + sacaorse (0,4 M) e 1% de floroglucinol;
- 6. PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*) 2:** glicerol (30%), etileno glicol (15%), DMSO (15%), sacarose (13,6%);
- 7. PVS3 (*Plant Vitrification Solution 3*):** glicerol (50%) e sacarose (50%).

Para o estabelecimento de protocolo de criopreservação em *Pfaffia glomerata*, vários ensaios preliminares foram realizados, tendo como objetivo determinar as melhores condições de cultivo e concentrações das diferentes soluções utilizadas em processo de criopreservação (dados não mostrados; Tabelas 1, 2, 3, 4).

**Tabela 1.** Exposição de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata* a concentrações variáveis de sacarose em solução de pré-cultivo e diferentes tempos em solução de saturação.

Tratamentos	Sacarose	Solução Saturação
	Concentração (M)	Tempo (min)
T1	0	20
T2	0,5	20
T3	0,75	20
T4	1	20
T5	1,25	20
T6	1,5	20
T7	0	80
T8	0,5	80
T9	0,75	80
T10	1	80
T11	1,25	80
T12	1,5	80

**Legenda:** Solução de pré-cultivo 1: por uma hora; Solução de saturação 1: por 20 e 80 minutos.

**Tabela 2.** Exposição de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata* à duas concentrações de sacarose em solução de pré-cultivo, associados à duas soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3) e presença e ausência de nitrogênio líquido.

Tratamento	Soluções			
	Pré- cultivo (M)	Saturação (min)	Crioprotetora	NL
T1	0,75	80	PVS2	Presente
T2	0,75	80	PVS2	Ausente
T3	0,75	80	PVS3	Presente
T4	0,75	80	PVS3	Ausente
T5	0,75	80	Ausente	Presente
T6	0,75	80	Ausente	Ausente
T7	1,0	80	PVS2	Presente
T8	1,0	80	PVS2	Ausente
T9	1,0	80	PVS3	Presente
T10	1,0	80	PVS3	Ausente
T11	1,0	80	Ausente	Presente
T12	1,0	80	Ausente	Ausente

**Legenda:** Solução de pré-cultivo 2; Solução de Saturação 1; PVS2 (2): por uma hora; PVS3: por uma hora; NL: nitrogênio líquido, por uma hora em contato com material vegetal.

**Tabela 3.** Exposição de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata* por diferentes tempos em solução crioprotetora (PVS2), com presença e ausência de nitrogênio líquido.

Tratamentos	PVS2	
	Tempo de exposição (min)	NL
T1	30	Presente
T2	30	Ausente
T3	60	Presente
T4	60	Ausente
T5	120	Presente
T6	120	Ausente
T7	180	Presente
T8	180	Ausente
T9	240	Presente
T10	240	Ausente
T11	300	Presente
T12	300	Ausente

**Legenda:** PVS2 (2); NL: nitrogênio líquido, por uma hora em contato com material vegetal.

**Tabela 4.** Exposição de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata* em diferentes concentrações de solução crioprotetora (PVS2), com presença e ausência de nitrogênio líquido.

Tratamentos	PVS2						NL
	Concentração (%)	Tempo (min)	Concentração (%)	Tempo (min)	Concentração (%)	Tempo (min)	
T1	60	30	100	40	-	-	Presente
T2	60	30	100	40	-	-	Ausente
T3	80	30	100	40	-	-	Presente
T4	80	30	100	40	-	-	Ausente
T5	60	30	80	30	100	40	Presente
T6	60	30	80	30	100	40	Ausente

**Legenda:** PVS2 (2); NL: nitrogênio líquido, por uma hora em contato com material vegetal.

## **2.2 A propagação fotoautotrófica e fotomixotrófica de *Pfaffia glomerata* rustificam plantas para suportar temperaturas ultra-baixas de criopreservação?**

Para o estabelecimento das plantas em condições fotoautotróficas e fotomixotróficas, três segmentos nodais (~ 1,5 cm) do acesso 4 de *Pfaffia glomerata* previamente estabelecido *in vitro*, foram introduzidos em frascos de vidro com dimensões de 7,5 cm X 15,5 cm contendo 15 g de vermiculita e 7,5 g de celulose, sem adição fontes de carboidratos (condição fotoautotrófica), como também a adição de 120 mL de sais e vitaminas MS suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose como fonte de carboidratos (condição fotomixotrófica). Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno rígido, com dois orifícios cobertos por duas membranas de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45 µm de poro (MilliSeal® Air Vent, Tóquio, Japão), para possibilitar as trocas gasosas e estimular a fotoautotrofia ou fotomixotrofia das plantas.

Os frascos foram acondicionados em sala de crescimento a 25 ± 2 °C sob irradiância de 41 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, e aos 45 dias após o estabelecimento do material, iniciaram-se as etapas do protocolo de criopreservação, descritas a seguir.

Para o processo de criopreservação, foram utilizados explantes oriundos de condições fotoautotrófica e fotomixotrófica (~1 cm), sendo estes introduzidos em meio MS, permanecendo por cinco dias a 4 °C e na ausência de luz, seguindo a metodologia modificada e descrita por Ming-Hua & Sen-Rong (2010). Posteriormente, os explantes foram transferidos para solução de pré-cultivo contendo meio MS líquido acrescido de sacarose (0,75 M), 0,5 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,5 µM de ácido α-naftalenoacético (ANA), por 24 horas, sob agitação constante a temperatura de 4 °C, seguindo a metodologia adaptada de Khoddamzadeh et al. (2011). Após, os explantes foram submersos em solução de saturação por 80 minutos, seguindo a metodologia descrita por Ming-Hua & Sen-Rong (2010). Os explantes foram então submetidos aos tratamentos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Pré aclimatização de explantes de *Pfaffia glomerata* (em condições fotoautotróficas e fotomixotróficas), para criopreservação, utilizando duas soluções crioprotetoras e presença e ausência de nitrogênio líquido.

Tratamentos	Condição de cultivo	Solução crioprotetora	NL
T1	Fotomixotrófica	PVS2	Presente
T2	Fotomixotrófica	PVS2	Ausente
T3	Fotoautotrófica	PVS2	Presente
T4	Fotoautotrófica	PVS2	Ausente
T5	Fotomixotrófica	PVS3	Presente
T6	Fotomixotrófica	PVS3	Ausente
T7	Fotoautotrófica	PVS3	Presente
T8	Fotoautotrófica	PVS3	Ausente

**Legenda:** **Condição de cultivo:** Fotomixotrófica: com adição de fonte de carboidrato; Fotoautotrófica: sem adição de fonte de carboidrato; **PVS2 (2):** por uma hora; **PVS3:** por uma hora; **NL:** nitrogênio líquido, por uma hora em contato com material vegetal.

Depois de imersos em nitrogênio líquido, os explantes passaram por descongelamento à aproximadamente 38-40 °C, por cerca de dois minutos. Após aplicação dos tratamentos e descongelamento, os explantes foram submetidos a três lavagens de 15 minutos cada, com meio MS líquido contendo sacarose (1,2 M), acrescida de 0,5 µM de BAP e 0,5 µM de ANA. Em complemento ao protocolo, realizou-se uma hidratação com meio MS líquido contendo sacarose (0,3 M), acrescida de 0,5 µM de BAP e 0,5 µM de ANA, por 20 minutos, adaptando a metodologia de Heringer et al. (2013). Ao fim da hidratação, os segmentos foram recuperados em meio MS acrescido de 0,5 µM de BAP e 0,5 µM de ANA, e mantidos em ausência de luz por três dias e posteriormente foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de 41 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, por 30 dias.

### 2.2.1 Delineamento experimental

Para avaliação da melhor combinação dos fatores, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Com esquema fatorial 2x2x2, sendo duas condições de cultivo (fotoautotrófica e fotomixotrófica), duas soluções crioprotetoras (PVS2 (2) e PVS3) e ausência ou presença de nitrogênio líquido,

totalizando 8 tratamentos, com 10 repetições por tratamento. A unidade experimental constituída por um tubo de ensaio contendo um explante. Os parâmetros de crescimento, comprimento de parte aérea, enraizamento, oxidação e número de folhas foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GENES (Cruz, 2013).

### **2.2.2 Caracterização anatômica**

Explantos foram coletados e fixados em solução modificada de Karnovsky. (1965), permanecendo refrigerado. As amostras fixadas foram desidratadas em série crescente de etanol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95%) e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais e longitudinais com 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de toluidina (pH 3,2) para caracterização estrutural (O'Brien & McCully, 1981). As lâminas foram montadas em Permount® SP15-500 (Fisher Chemicals-Fisher Scientific), e as imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.).

### **2.3 Os genótipos de *Pfaffia glomerata* suportam diferentemente as condições de temperaturas ultrabaixas gerados processo de criopreservação?**

Foram utilizados segmentos nodais dos acessos 4, 67, 69, 73 pertencente ao banco de germoplasma de *Pfaffia glomerata*, do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais – BIOAGRO/UFV, sendo subcultivados, a cada 30 dias em meio de cultura constituído por sais e vitaminas de MS e mantidas a  $25 \pm 2$  °C sob irradiância de  $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

Após esse período, três segmentos nodais (~ 1,5 cm) dos diferentes acessos *P. glomerata* (4, 67, 69, 73) foram introduzidos em frascos de vidro com dimensões de 7,5 cm X 15,5 cm contendo 120 mL de sais e vitaminas MS,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, acrescido de diferentes reguladores de crescimento, os quais possuem potencial de induzir tolerância ao frio. Sendo: ácido abscísico (ABA) nas

concentrações de 4 e 40  $\mu\text{M}$ , Suzuki et al. (2006); e ácido salicílico (SA) nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$ , Pathirama et al. (2016), além das testemunhas, sem adição de regulador de crescimento.

Desse modo, os tratamentos foram organizados da seguinte forma, para cada um dos acessos: T1: 4  $\mu\text{M}$  ABA – Nitrogênio líquido (NL); T2: 4  $\mu\text{M}$  ABA + NL; T3: 40  $\mu\text{M}$  ABA – NL; T4: 40  $\mu\text{M}$  ABA + NL; T5: 10  $\mu\text{M}$  AS – NL; T6: 10  $\mu\text{M}$  AS + NL; T7: 100  $\mu\text{M}$  AS – NL; T8: 100  $\mu\text{M}$  AS + NL; T9: MSØ – NL; T10: MSØ + NL.

Todos frascos foram vedados com tampas de polipropileno rígido, com dois orifícios cobertos por duas membranas de PTFE, para possibilitar as trocas gasosas e estimular a fotomixotrofia das plantas, desencadeando crescimento mais vigoroso (Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2012). Esses frascos foram mantidos em BOD à temperatura de 12 °C com fotoperíodo de 16 horas sob irradiância de cerca de 62  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por 45 dias, com o objetivo de desenvolver tolerância a baixas temperaturas.

Aos 45 dias de manutenção dos frascos à baixa temperatura, procedeu-se as etapas de criopresevação. Os segmentos nodais dos diferentes acessos foram excisados e transferidos para solução de pré-cultivo acrescido de sacarose (0,75 M), sob agitação constante, por 24 horas à temperatura de 4 °C (Khoddamzadeh et al., 2011). Posteriormente, o material vegetal foi transferido para solução de saturação composta por glicerol (2 M) e sacarose (0,4 M) por 20 minutos, seguida de solução crioprotetora PVS2 descrita por Sakai (1995), composta por glicerol (30%), etileno glicol (15%), DMSO (15%), sacarose (13,6%), por uma hora, seguido por imersão em nitrogênio líquido. O tratamento controle foi aquele em que os explantes não passaram pelo processo de congelamento.

Após aplicação dos tratamentos, seguido de descongelamento, os explantes foram submetidos a três lavagens de 15 minutos cada com meio MS líquido contendo sacarose (1,2 M). Ao fim da lavagem, os segmentos foram recuperados em meio MS, e mantidos na ausência de luz por 15 dias, com transferência para sala de crescimento com intensidade luminosa reduzida (cerca de 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), por 50 dias, seguido de transferência para fotoperíodo de 16 horas de luz, sob irradiância de 41  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por 30 dias.

### **2.3.2 Delineamento experimental**

Para avaliação da melhor combinação dos fatores, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Com esquema fatorial 4x5x2, sendo quatro acessos (4, 67, 69, 73), dois reguladores de crescimento (ABA a 4 e 40  $\mu\text{M}$ ; SA a 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) e duas testemunhas adicionais, com meio de cultivo MS sem regulador de crescimento) e, ausência ou presença de nitrogênio líquido. Totalizou-se 40 tratamentos, com 10 repetições por tratamento. A unidade experimental foi composta por um tubo de ensaio por repetição. Realizou-se a análise de variância da variável porcentagem de sobrevivência, seguido de comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GENES (Cruz, 2013).

### **2.4 Variações nas soluções de saturação e vitrificação auxiliam no processo de criopreservação de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*?**

Segmentos nodais (~ 1 cm) foram introduzidos em meio MS e acrescido de 0,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA onde permaneceram por cinco dias a 4 °C e na ausência de luz, segundo Ming-Hua & Sen-Rong (2010). Posteriormente, os segmentos foram transferidos para solução de pré-cultivo com concentração de sacarose (0,75 M) por 24 horas, sob agitação constante a temperatura de 4 °C, seguindo metodologia de Khoddamzadeh et al. (2011). Após o pré-cultivo, os explantes foram submetidos aos seguintes tratamentos, conforme a Tabela 6.

**Tabela 6.** Imersão de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata* em diferentes soluções de saturação e vitrificação, com presença e ausência de nitrogênio líquido.

Tratamentos	Solução de Saturação	PVS2	NL
T1	1	1	Presente
T2	1	1	Ausente
T3	1	2	Presente
T4	1	2	Ausente
T5	2	1	Presente
T6	2	1	Ausente
T7	2	2	Presente
T8	2	2	Ausente

**Legenda:** **Solução de saturação 1:** por 20 minutos; **Solução de saturação 2:** por 80 minutos; **PVS2 (1):** por uma hora; **PVS2 (2):** por uma hora; **NL:** nitrogênio líquido, por uma hora em contato com material vegetal.

Após aplicação dos tratamentos, seguido de descongelamento, os explantes foram submetidos a três lavagens de 15 minutos cada com meio MS líquido contendo sacarose (1,2 M).

Ao fim das lavagens, os segmentos foram recuperados em meio MS, e mantidos em ausência de luz por 15 dias, com transferência para sala de crescimento com intensidade luminosa reduzida ( $\sim 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), por 50 dias e posteriormente transferência para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, sob irradiância de  $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por 30 dias.

#### 2.4.1 Delineamento experimental

Para avaliação da melhor combinação dos fatores, utilizou-se DIC. Com esquema fatorial 2x2x2, sendo duas concentrações de solução de saturação [glicerol (2 M) + sacarose (0,4 M), por 20 minutos; glicerol (2 M) + sacarose (1 M), por 80 minutos], duas composições de solução crioprotetora [PVS2 (1): glicerol (30%), etileno glicol (15%), DMSO (15%), meio MS  $\frac{1}{2}$  força + sacarose (0,4 M) e 1% de floroglucinol; PVS2 (2): glicerol (30%), etileno glicol (15%), DMSO (15%), sacarose (13,6%)] e, presença e ausência de nitrogênio líquido. Totalizou-se 8

tratamentos com 10 repetições por tratamento e a unidade experimental composta por tubo de ensaio contendo um explante por repetição. Os parâmetros de crescimento, comprimento de parte aérea, enraizamento, oxidação e número de folhas foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GENES (Cruz, 2013).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Variações nas concentrações de solução de pré-cultivo, saturação e vitrificação são eficientes para obter plantas criopreservadas de *Pfaffia glomerata*?**

De posse dos resultados dos testes preliminares, foi possível estabelecer qual a melhor concentração de pré-cultivo como também, o melhor tempo de imersão dos explantes em solução de saturação. Os explantes imersos em solução crioprotetora (PVS2 e PVS3) não sobreviveram quando foram expostos as temperaturas ultrabaixas do nitrogênio líquido (dados não mostrados). Desse modo, para a realização dos demais experimentos, optou-se por utilizar as soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3) no período e nas concentrações mais usuais demonstradas na literatura.

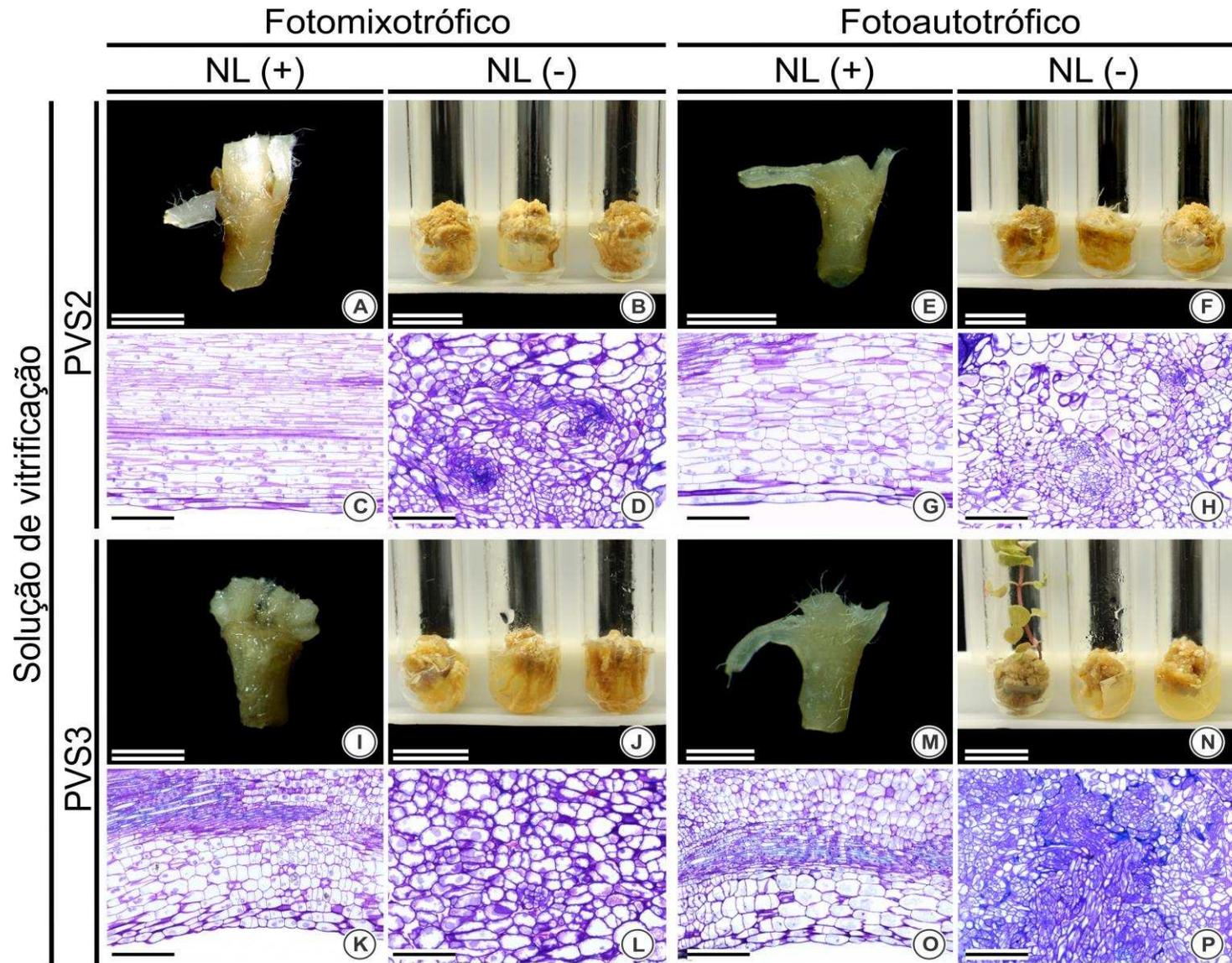
#### **3.2 Propagação fotoautotrófica e fotomixotrófica de *Pfaffia glomerata* rustificam plantas para suportar temperaturas ultrabaixas de criopreservação?**

Não houve diferenças significativas para as variáveis de crescimento analisadas. Dessa forma, pode-se afirmar que o processo de rustificação das plantas pelos cultivos fotoautotrófico e fotomixotrófico, não auxiliaram na tolerância do material vegetal aos processos criogênicos. Como também, a utilização de diferentes soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3) não aumentaram a taxa de regeneração de explantes após imersão em nitrogênio líquido.

Através da caracterização anatômica do material vegetal, foi possível observar diferenças estruturais durante a imersão dos explantes na solução de saturação [glicose (2 M), sacarose (1 M), por 80 minutos], a qual promoveu ruptura das membranas celulares, possibilitando alterações na composição e estrutura nuclear (Figuras 1C, 1G, 1K, 1O). Essas diferenças estruturais associadas aos demais estresses sofridos pelo material vegetal, durante as etapas de criopreservação, acarretam a morte celular, impedindo que ocorresse a regeneração dos explantes.

Por outro lado, foi possível observar que não houve diferenças entre as soluções crioprotetoras em tratamentos criopreservados (Figura 1A, 1E, 1I, 1M).

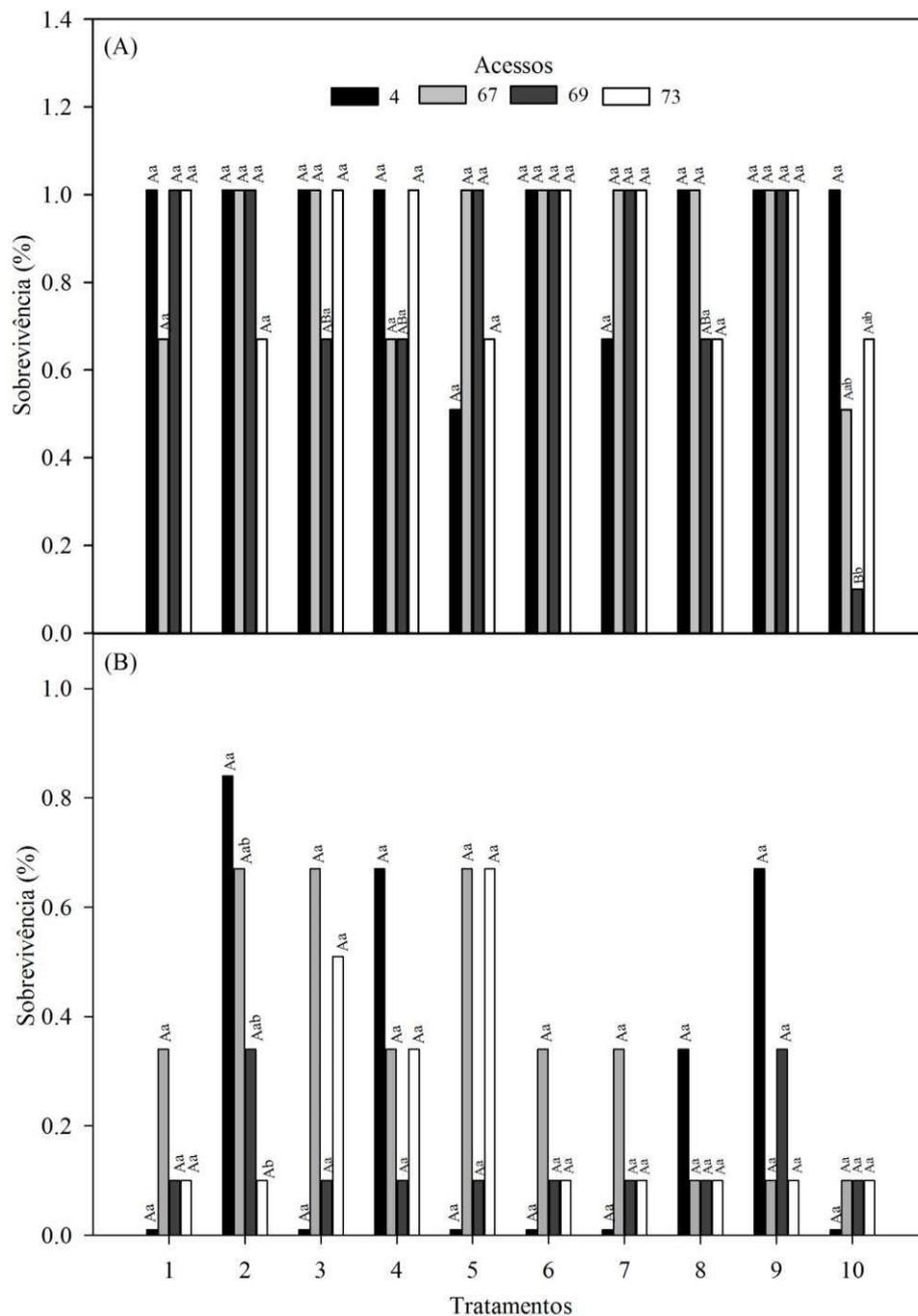
O desenvolvimento dos segmentos nodais mantidos nos tratamentos controle (sem imersão em nitrogênio líquido) foi variável em relação ao tipo de solução crioprotetora (PVS2 e PVS3), e as elevadas concentrações dos reguladores de crescimento (5  $\mu$ M de BAP e 0,5  $\mu$ M de ANA) acrescidos em algumas etapas do processo e na regeneração dos explantes (Figuras 1B; 1F; 1J; 1N), gerando calos desorganizados com presença de raízes.



**Figura 1.** Explantes de *Pfaffia glomerata* cultivados em diferentes condições (fotoautotrófico e fotomixotrófico) e regenerados após criopreservação, utilizando solução de vitrificação - PVS2 (2): por uma hora; PVS3: por uma hora e presença e ausência de nitrogênio líquido. **(A, C)** segmento nodal e corte transversal cultivado em condição fotomixotrófica, criopreservado com solução de vitrificação PVS2 e exposto ao nitrogênio líquido; **(B, D)** condição fotomixotrófica, criopreservado com PVS2 sem exposição ao nitrogênio líquido; **(E, G)** condição fotoautotrófica, criopreservado com PVS2 e exposto ao nitrogênio líquido; **(F, H)** condição fotoautotrófica, criopreservado com PVS3 sem exposição ao nitrogênio líquido; **(I, K)** condição fotomixotrófica, criopreservado com PVS3 e exposto ao nitrogênio líquido; **(J, L)** condição fotomixotrófica, criopreservado com PVS3 sem exposição ao nitrogênio líquido **(M, O)** condição fotoautotrófica, criopreservado com PVS3 e exposto ao nitrogênio líquido; **(N, P)** condição fotoautotrófica, criopreservado com solução PVS3 sem exposição ao nitrogênio líquido; Barras: 20mm e 200  $\mu\text{m}$ .

### **3.3 Os genótipos de *Pfaffia glomerata* suportam diferentemente as condições de temperaturas ultrabaixas gerados processo de criopreservação?**

A avaliação de sobrevivência aos 15 dias, dos acessos 4, 67, 69, 73 ao saírem da ausência de luz, mostrou que os explantes de todos os tratamentos estavam vivos, possibilitando potencial desenvolvimento do material, exceto para o acesso 69 nas condições com presença de ABA, o qual apresentou menores níveis de sobrevivência (Figura 2A). Na avaliação de sobrevivência aos 50 dias, dos acessos 4, 67, 69, 73 sob irradiância reduzida, mostra que os explantes de todos os tratamentos estavam inviáveis, e impossibilitados de qualquer tipo de regeneração (Figura 2B).



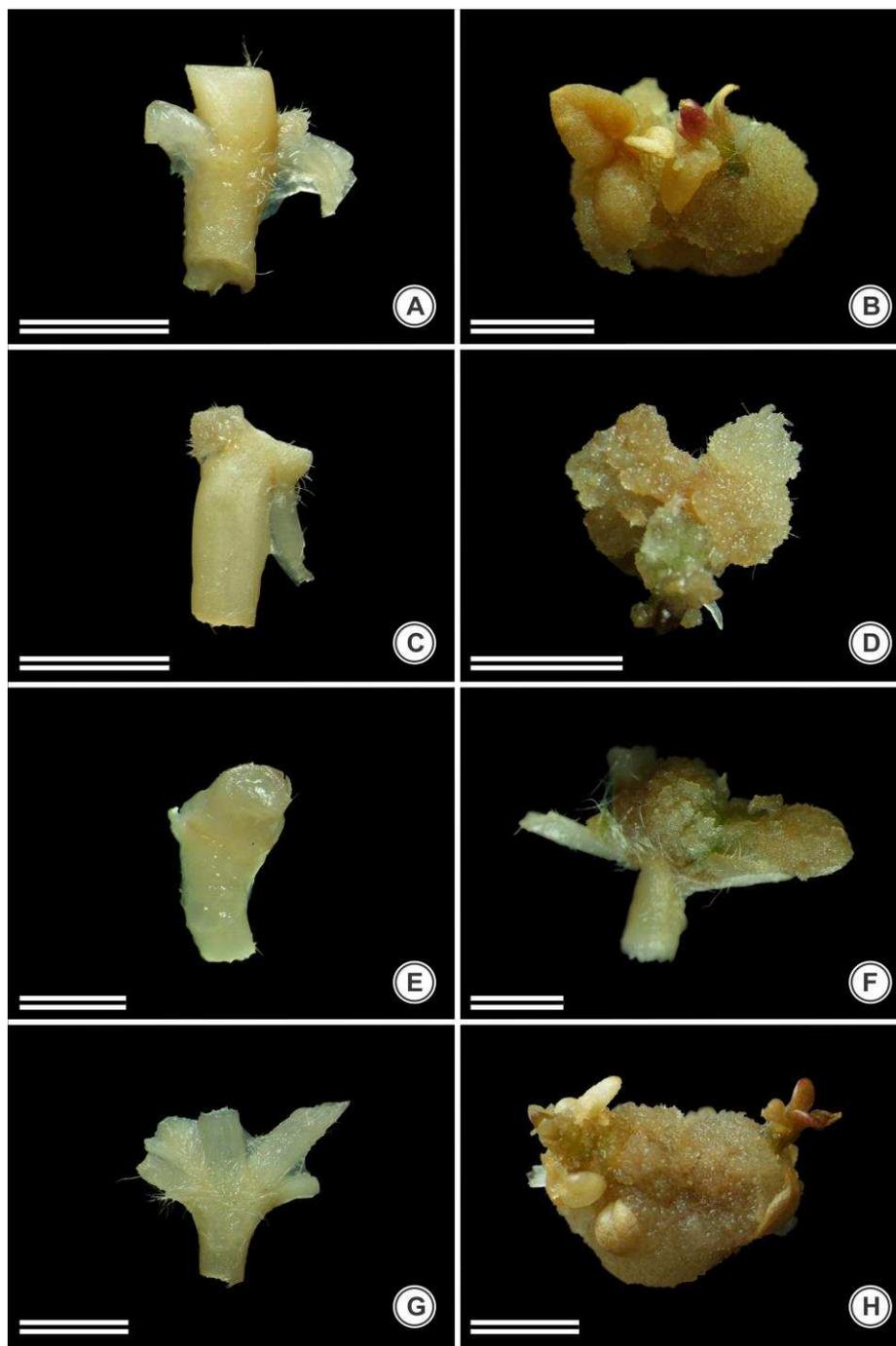
**Figura 2.** Sobrevivência dos acessos de *Pfaffia glomerata* criopreservados e não criopreservados. **(A)** avaliação da sobrevivência aos 15 dias dos explantes dos acessos 4, 67, 69 e 73; **(B)** avaliação da sobrevivência aos 50 dias dos explantes dos acessos 4, 67, 69 e 73; **(A; B)** Comparação de diferentes tratamentos em cada acesso individual, letras maiúsculas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Comparação entre os acessos, dentro do mesmo tratamento, letras minúsculas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. **Legenda tratamentos 1:** 4  $\mu$ M ABA – NL; **2:** 4  $\mu$ M ABA + NL; **3:** 40  $\mu$ M ABA – NL; **4:** 40  $\mu$ M ABA + NL; **5:** 10  $\mu$ M AS – NL; **6:** 10  $\mu$ M AS + NL; **7:** 100  $\mu$ M AS – NL; **8:** 100  $\mu$ M AS + NL; **9:** MSØ – NL; **10:** MSØ + NL.

### **3.4 Variações nas soluções de saturação e crioprotetora auxiliam no processo de criopreservação de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*?**

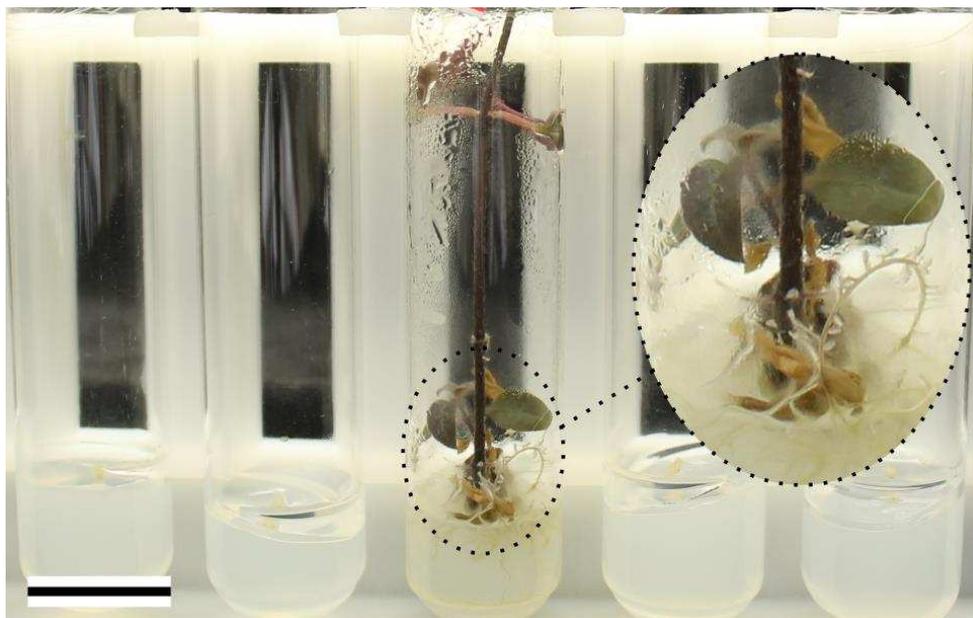
Foi possível constatar a recuperação de material criopreservado no T3. Da mesma forma, observou-se que a intensidade luminosa estabelecida de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi prejudicial aos explantes, uma vez que na ausência de luz, foi possível observar a emissão de pequenas gemas e raízes no qual, ao serem expostos à luz, oxidaram rapidamente, sendo possível a recuperação de apenas um explante.

Para a variável comprimento da parte aérea, observou-se que a solução de saturação 1 combinada com a solução crioprotetora 2 (Tabela 6), na presença de nitrogênio líquido obtiveram maiores valores numéricos, contudo, não houve diferença significativa. O mesmo ocorreu para a variável número de folhas, no qual solução de saturação 1, combinada com a solução crioprotetora 2 na presença de nitrogênio líquido, apresentou maiores valores numéricos, no entanto, sem diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Já para a variável oxidação, diferentes soluções de saturação, na presença e ausência de nitrogênio líquido demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), com diminuição da taxa de oxidação do material.

Da mesma forma, foi observado morte dos explantes criopreservados e o desenvolvimento de calos em explantes não criopreservados (Figura 3). Exceto para o T3 que melhor se desenvolveu, apresentando apenas uma planta regenerada, mesmo após submetido a temperaturas ultra baixas (Figura 4).



**Figura 3.** Segmentos nodais do acesso 4 de *Pfaffia glomerata* aos 30 dias, após o procedimento de criopreservação. **A** (T1) solução de saturação 1; PVS2 (1); imersão em nitrogênio líquido; **B** (T2) solução de saturação 1; PVS2 (1); sem imersão em nitrogênio líquido; **C** (T3) solução de saturação 1; PVS2 (2); imersão em nitrogênio líquido; **D** (T4) solução de saturação 1; PVS2 (2); imersão sem imersão em nitrogênio líquido; **E** (T5) solução de saturação 2; PVS2 (1); imersão em nitrogênio líquido; **F** (T6) solução de saturação 2; PVS2 (1); sem imersão em nitrogênio líquido; **G** (T7) solução de saturação 2; PVS2 (2); imersão em nitrogênio líquido; **H**: (T8) solução de saturação 2; PVS2 (2); sem imersão em nitrogênio líquido. Barras A- H: 3mm.



**Figura 4.** Explante criopreservado do tratamento 3 (T3), do acesso 4 de *Pfaffia glomerata*, utilizando solução de saturação composta por glicerol (2 M) + sacarose (0,4 M), por 20 minutos; PVS2 composto por glicerol (30%), etileno glicol (15%), DMSO (15%), sacarose (13,6%) e imersão em nitrogênio líquido. Barra: 20 mm.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Variações nas concentrações de soluções utilizadas no processo de vitrificação foram necessárias para se obter protocolo inicial de criopreservação para *Pfaffia glomerata*

Até o presente momento não foram encontrados trabalhos na literatura que relatem protocolos de criopreservação para a espécie *Pfaffia glomerata*. Desse modo, a técnica de vitrificação, comumente usada em procedimentos de criopreservação, foi escolhida para ser utilizada em todos os testes preliminares, no qual se baseia no fenômeno de vitrificação (Fahy et al., 1984; Santos, 2000; Engelmann, 2011). Nesse contexto, o maior desafio no estabelecimento de protocolos criogênicos é realizar o congelamento sem que ocorra a formação de cristais de gelo no interior das células, que de maneira geral, podem causar uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos aos tecidos (Santos, 2000; Carvalho, 2007).

Através das diferentes concentrações de sacarose na solução de pré-cultivo foi possível identificar qual a concentração mais eficiente para *Pfaffia glomerata*, uma vez que cada espécie e cada tecido vegetal a ser criopreservado apresentam reações diferentes para cada procedimento criogênico (Ming-Hua & Sen-Rong, 2010; Hirano et al., 2011). A presença de sacarose foi considerada essencial em procedimentos criogênicos pois exerce papel fundamental na adaptação das células vegetais aos diversos tipos de estresse, sendo considerada um dos principais componentes osmóticos, por ser o carboidrato mais comumente translocado nas plantas (Carpentier et al., 2010; Benelli et al., 2013).

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares foi possível afirmar que para solução de pré-cultivo, a concentração que desempenhou melhor desenvolvimento de segmentos nodais de *P. glomerata* foi a concentração de 0,75 M de sacarose, por 24 horas. Da mesma forma, foi observado que a solução de saturação, descrita por Ming-Hua & Sen-Rong (2010), ocasionou maiores taxas de regeneração dos explantes. Desse modo, a partir dos testes preliminares foi observado uma tendência de que a solução de pré-cultivo na concentração de

(0,75 M) por 24 horas e a solução de saturação composta por glicerol (2 M) e sacarose (1 M), por 80 minutos seriam eficientes para regeneração de segmentos nodais de *P. glomerata*.

Para que fosse possível utilizar técnicas criogênicas em materiais biológicos, Simione (2013) descreveu a necessidade das combinações de concentração, composição e período de determinadas soluções. Dessa forma, inúmeros compostos vêm sendo utilizados como agentes crioprotetores, entre eles os solventes e os açúcares. Nesse caso, o dimetil sulfoxido (DMSO) e o glicerol têm sido amplamente utilizados para muitas espécies, demonstrando eficácia na preservação de tecidos vivos, uma vez que DMSO realiza uma maior desidratação, devido à sua característica penetrante na célula. Normalmente se utiliza o glicerol por causar menos efeitos nocivos ao material vegetal uma vez que, este composto apresenta menor toxicidade quando comparado ao DMSO, por exemplo.

Yin & Rong (2009) relataram que o período de incubação e da temperatura da solução de vitrificação são fatores importantíssimos para determinar a sobrevivência dos explantes. De modo que superexposição de tecidos vegetais em solução de PVS2 pode conduzir à toxicidade química e osmótica, além de estresse excessivo. O tempo de exposição ideal é muito variável em diferentes espécies, além de se mostrar dependente da temperatura estabelecida durante a exposição do material à solução. A exemplo, em sementes de *Dendrobium cariniferum* o tempo de exposição ótimo foi de 60 minutos combinado com temperaturas baixas (Pornchuti & Thammasiri, 2008).

Por outro lado, Engelmann (2011) e Heringer et al. (2013) afirmaram que a utilização da solução de vitrificação PVS3 pode ser utilizada em espécies com sensibilidade ao DMSO. Devido às suas características tóxicas ao material vegetal, além de causar danos celulares, sejam eles por toxicidade química ou tensão excessiva durante a desidratação osmótica.

Para segmentos nodais de *P. glomerata*, diferentes tempos de incubação em PVS2, não diferenciou no crescimento e desenvolvimento de explantes criopreservados. Por outro lado, foi possível observar que explantes tratados com PVS3 obtiveram maiores taxas de mortalidade mesmo em tratamentos controle (sem exposição ao nitrogênio líquido), concluindo que, para *P. glomerata*, a

solução de vitrificação PVS2 é mais eficiente e confirmando que etapas do processo de criopreservação devem ser testadas e analisadas para cada espécie e tecido vegetal.

#### **4.2 Propagação fotoautotrófica e fotomixotrófica de *Pfaffia glomerata* não rustificam plantas para suportar temperaturas ultrabaixas de criopreservação**

*Pfaffia glomerata* apresenta elevado potencial para o cultivo *in vitro*, apresentando crescimento satisfatório para sistema fotoautotrófico como fotomixotrófico (Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2012, 2014). Entretanto, para ensaios de criopreservação, a rustificação das plantas como pré-tratamento não mostrou diferenças significativas na recuperação do material vegetal.

Do mesmo modo, através das análises anatômicas (Figura 1C; 1G; 1K; 1O), foi possível observar diferenças durante as etapas de criopreservação. Estas desordens celulares corroboram com os dados de Heringer et al. (2013), no qual demonstraram que determinadas soluções crioprotetoras, mesmo na ausência de nitrogênio líquido, tem a capacidade de romper parede celular, desenvolvendo citoplasma denso e extensa vacuolização. Essas características também são demonstradas por Sershen et al. (2012), que afirmam que qualquer solução crioprotetora com elevada concentração de glicerol e/ ou sacarose tem a capacidade de retrair o citoplasma, aumentando a proporção vacuolar.

Por outro lado, Fraga et al. (2016) relataram que em um protocolo de criopreservação bem estabelecido, as células são capazes de apresentar elevado número de núcleos proeminentes, presença abundante de mitocôndrias, vacúolos pequenos, amiloplastos contendo grãos de amido além de parede celular espessa e preservada. Da mesma forma, Gantait et al. (2015) afirmaram que embriões somáticos de *Elaeis guineensis* após exposição em nitrogênio líquido, apresentaram desenvolvimento de meristema apical e primórdios foliares, conferindo elevada taxa de regeneração ao material vegetal.

Assim, diferentes soluções de vitrificação podem ser utilizadas no processo de criopreservação, a solução PVS3 a qual é composta por glicerol e sacarose em proporções semelhantes geralmente é utilizada para espécies sensíveis aos componentes tóxicos do PVS2, em especial ao DMSO

(Englemann-Sylvestre & Englemann, 2015). Nesse sentido, Makowski et al. (2016) demonstraram elevada regeneração de explantes de *Osmunda regalis* tratados com PVS3, com cerca de 62%, ao passo que a regeneração de explantes tratados com PVS2 não alcançou 10% de regeneração. Essa diferença pode ser explicada devido as propriedades químicas de cada solução, além da capacidade da espécie em suportar os efeitos tóxicos da solução de PVS2.

Para segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*, sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas, nenhum dos tratamentos criopreservados (explante submetidos à exposição ao nitrogênio líquido) foram capazes de regenerar (Figura 1A; 1E; 1I; 1M). Entretanto, em tratamentos controle, (sem exposição dos explantes ao nitrogênio líquido) houve crescimento e desenvolvimento desorganizado. Dessa forma, constata-se que a solução de vitrificação PVS3 proporcionou desarranjos celulares, aumentam o tamanho vacuolar, e restringiu o desenvolvimento do núcleo.

Da mesma forma, quando em contato com PVS2, poucos explantes do tratamento controle também demonstraram desorganização celular, o que provavelmente pode-se inferir a elevada concentração dos componentes da solução de saturação. Como também longo período em que o explante fica em contato com essa solução, assim como ao DMSO, com seu elevado poder de desidratação aliado à sua capacidade de penetração induziram desarranjo celular. Por outro lado, alguns explantes dos tratamentos controles tratados com PVS2, demonstraram desenvolvimento normal. Dessa forma, provavelmente a condição fisiológica do explante pode estar correlacionada à sua capacidade de regeneração. Destaque-se que o tamanho do explante é fundamental para que se obtenha sucesso no processo de criopreservação, sendo que este deve apresentar características meristemáticas ou potencial de regeneração, uma vez que apenas materiais com citoplasma denso e pequenos vacúolos podem sobreviver ao congelamento (Kulus & Zalewska, 2014; Marković et al., 2014).

#### **4.3 Genótipos de *Pfaffia glomerata* suportam as condições de temperaturas ultrabaixas gerados processo de criopreservação**

Na avaliação de sobrevivência, aos 15 dias sob ausência total de luz, foi possível observar que as concentrações de ABA (4 e 40  $\mu\text{M}$ ) e SA (10 e 100  $\mu\text{M}$ )

aplicadas em todos os acessos (4, 67, 69 e 73) foram eficientes na proteção dos explantes e na possível indução de tolerância. Houve excelente taxa de sobrevivência em todos tratamentos, o qual possibilitou o desenvolvimento de gemas laterais, como também coloração esverdeada, característica de explantes em desenvolvimento. Indicando que, o material manteve sua integridade durante o processo de criopreservação. Esses resultados corroboram com os de Bruňáková & Čellárová (2016) e Parthirana et al. (2016), os quais afirmam que ABA e SA promovem proteção em níveis fisiológicos e estruturais, manutenção dos tecidos meristemáticos, do aparato fotossintético e inibição de enzimas do estresse oxidativo.

De modo geral, o uso de reguladores de crescimento combinados com baixas temperaturas promovem a remoção do excesso de água intracelular, por gradiente osmótico e por interferirem na síntese do ácido giberélico, inibindo assim, o crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais (Scherwinski-Pereira & Costa, 2014). Semelhantemente, alguns autores vem utilizando baixas temperaturas combinadas aos reguladores de crescimento em meio de cultura, com a finalidade de obter maiores níveis de regeneração de explantes após os processos de criopreservação. Suzuki et al. (2006) e Lu et al. (2009) afirmaram que pré tratamento com ABA combinado com sacarose foi importante para criopreservar segmentos nodais de *Gentiana lutea* e *Ginkgo biloba* L.

No entanto, os teores de ABA podem ser aumentados durante a pré-aclimatização ao frio, uma vez que esse regulador de crescimento possibilita diferentes mecanismos fisiológicos, acarretando em alterações celulares, o que possibilita tolerância ao dessecamento, devido a redução da velocidade de perda de água pelas células vegetais e ao mesmo tempo mantêm preservado os tecidos meristemáticos e a estabilização do aparato fotossintético (Bruňáková & Čellárová, 2016).

Semelhantemente, Repka (2001) e Li et al. (2011) relataram que o SA é um elicitor de proteínas, agindo na defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos, além de estar relacionado com sinalizações de indução de crescimento. A tolerância induzida por SA à refrigeração está relacionada com o aumento da atividade das enzimas anti-oxidantes, como por exemplo, superóxido desmutase, catalase, peroxidase, polifenol oxidase, ascorbato peroxidase e fenilalanina

amônia liase, transcrevendo elevado número de genes responsivos ao estresse (Taşgin et al., 2006; Cao et al., 2009; Li et al., 2011; Chen et al., 2011; Mutlu et al., 2013; Dong et al., 2014). Parthirana et al. (2016) demonstraram que a aplicação exógena de SA na concentração de 0,01 mM auxiliou no aumento da regeneração de *Vittis* spp. criopreservados, ao passo que concentrações mais elevadas de SA resultou menores taxas de regeneração, quando submetidos à procedimentos criogênicos. Da mesma forma, Benelli et al. (2013) afirmam que a introdução de SA como pré-tratamento, possibilitou aumento da tolerância à elevada desidratação causada pelo PVS2, como também auxiliou no processo de tolerância ao congelamento. Esses dados afirmam que a resposta da planta ao incremento exógeno de AS é dependente da dose aplicada, o que interfere em vias de sinalização distintas.

Por outro lado, durante a avaliação de sobrevivência após 50 dias em sala de crescimento com irradiância reduzida constatou-se que em tratamentos criopreservados, elevado índice de mortalidade, sendo possível observar explantes cloróticos. Estes resultados corroboram com os de Parthirana et al. (2016), no qual observaram considerável taxa de mortalidade de explantes de *Vittis* spp., quando utilizadas elevadas concentrações de SA, com material vegetal clorótico após criopreservação.

Conforme foi observado na avaliação de sobrevivência aos 15 dias, a adição de diferentes reguladores de crescimento ao meio de cultura sob baixa temperatura resultou em uma taxa considerável de sobrevivência de explantes criopreservados, demonstrando uma tendência dos genótipos de *Pfaffia glomerata* em serem tolerantes aos processos de criopreservação.

Por outro lado, na avaliação de sobrevivência aos 50 dias, notou-se elevada taxa de mortalidade. Como as avaliações foram extremamente contrastantes, acredita-se que os reguladores de crescimento utilizados como pré aclimatização foram eficientes, induzindo tolerância do material vegetal. Contudo, o reestabelecimento do material à presença de luz não está ajustado para as condições necessárias desses explantes, uma vez que, qualquer material criopreservado, em virtude do elevado grau de estresse, necessita de condições especiais para seu desenvolvimento. Da mesma forma, o meio de cultivo utilizado

como também as condições de luminosidade não estão adequadas para regeneração dos explantes criopreservados.

Desse modo, novos testes deverão ser realizados para que seja possível ajustar de forma eficiente as condições de regeneração, incluindo substâncias antioxidantes e intensidades luminosas mais adequadas para otimizar a taxa de recuperação dos explantes criopreservados.

#### **4.4 Solução de saturação contendo 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose combinada com solução crioprotetora PVS2 tradicional auxiliam no processo de criopreservação de segmentos nodais de *Pfaffia glomerata***

A utilização de solução de saturação composta por glicerol (2 M) e sacarose (0,4 M) combinada com PVS2 acrescido de 1% de floroglucinol, promove a proteção adequada para que explantes de *Dendrobium* possam suportar a criopreservação. Estas soluções podem promover melhores taxas de sobrevivência de células e tecidos criopreservados (Vendrame & Faria, 2011). Da mesma forma, Towill (2002) afirmou que soluções de saturação tem a capacidade de aumentar a permeabilidade da parede celular, facilitando a ação de agentes crioprotetores, reduzindo os danos causados pelo estresse osmótico devido à exposição à solução de vitrificação. A composição e a concentração da solução de saturação podem ser variáveis. Nesse sentido, Sen-Rong & Ming-Hua (2012), demonstraram que a solução de saturação composta por glicerol (2 M) e sacarose (0,4 M), combinada com PVS2, resultou cerca de 60% de regeneração de calos embriogênicos de *Anemarrhena asphodeloides*. Por outro lado, Ming-Hua & Sen-Rong (2010) afirmaram que a solução de saturação composta por glicerol (2 M) e sacarose (1 M), combinada com PVS2, possibilitou a sobrevivência de 76,3% de calos embriogênicos criopreservados de *Dioscorea bulbifera*.

No presente trabalho, a solução de saturação descrita por Ming-Hua & Sen-Rong (2010) e aplicada nos segmentos nodais de *P. glomerata*, ocasionou morte do material vegetal. Entretanto, a solução de saturação descrita por Vendrame & Faria (2011) proporcionou proteção eficiente sem causar danos às células e, quando combinadas com solução crioprotetora e nitrogênio líquido, foi possível observar a regeneração dos explantes criopreservados. Dessa forma, pode se afirmar que a solução de pré-cultivo na concentração de 0,75 M de

sacarose por 24 horas e a solução de saturação composta por glicerol (2 M) e sacarose (0,4 M) por 20 minutos é eficiente para regeneração de *P. glomerata*.

Por outro lado, a utilização de diferentes soluções de PVS2 podem acentuar o desempenho de materiais criopreservados. Li et al. (2016) demonstraram que a solução de PVS2 descrita por Sakai (1995), a qual consiste em meio MS suplementado com 30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% de DMSO e sacarose (0,4M), possibilitou a regeneração de explantes transgênicos de *Torenia fournieri*, podendo ser considerada uma ferramenta confiável para conservação a longo prazo das culturas vegetais, uma vez que não foram detectadas diferenças morfológicas e genéticas no material criopreservado. Da mesma forma, Zhang et al. (2015) relataram que com a exposição de segmentos nodais de *Petunia × atkinsiana* em solução de PVS2 tradicional, foi possível obter 81% de regeneração dos explantes criopreservados. Entretanto, Galdiano Júnior et al. (2012) demonstraram que a solução de PVS2 complementada com 1% de floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno) proporcionou uma taxa de germinação de 79,3% de *Dendrobium Swartz*. Acredita-se que as propriedades antioxidantes, desse composto auxiliam tanto na recuperação como também na sobrevivência dos explantes, através da redução do estresse oxidativo (Kang et al., 2006).

Para explantes criopreservados de *P. glomerata*, a solução de vitrificação que demonstrou melhor resultado foi a solução de PVS2 tradicional, sem complemento de meio MS e floroglucinol. Desse modo, é possível afirmar que a solução de saturação composta por glicerol (2 M) e sacarose (0,4 M) combinada com a solução de vitrificação (PVS2) é eficiente para recuperação de segmentos nodais de *P. glomerata*, possibilitando tanto a recuperação como também o crescimento do material, com presença de raízes, nós e folhas característicos da espécie. Contudo, as condições de regeneração ainda não são eficientes, uma vez que, na presença de luz, observou-se elevada taxa de mortalidade.

Dessa forma, modificações nas condições de regeneração, tanto na composição de meio de cultivo como na adequação de intensidade luminosa devem ser realizadas para que seja possível se obter uma melhor taxa de sobrevivência de material criopreservado.

## 5. REFERÊNCIAS

BAKRIM, A.; MARIA, A.; SAYAH, F.; LAFONT R.; TAKVORIAN, N. Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): Biosynthesis, transport and regulation of levels. **Plant Physiology and Biochemistry**, 46: 844 – 854, 2008.

BENELLI, C.; DE CARLO, A.; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. **Biotechnology Advances**, 31: 175 – 185, 2013.

BRUŇÁKOVÁ, K., ČELLÁROVÁ, E. Conservation Strategies in the Genus *Hypericum* via Cryogenic Treatment. Review. **Frontiers in Plant Science**, 7: 558, 2016.

CAO, S. F.; HU, Z. C.; WANG, H. O. Effect of salicylic acid on the activities of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in cucumber fruit in relation to chilling injury. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 84: 125–130, 2009.

CARPENTIER, S. C.; ERTOMMEN, A.; SWENNER, R.; WITTERS, E.; FORTES, C.; SOUZA JÚNIOR, M. T.; PANIS, B. Sugar-mediated acclimation: the importance of sucrose metabolism in meristems. **Journal of Proteome Research**, 9: 5038 - 5046, 2010.

CARVALHO, F. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência e Agrotecnologia**, 31: 814 – 820, 2007.

CHEN, S.; LIU, Z.; CUI, J.; DING, J.; XIA, X.; LIU, D.; YU, J. Alleviation of chilling-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment and related gene expression in eggplant seedlings. **Plant Growth Regulation**, 65: 101– 108, 2011.

CORRÊA, J. P. O.; VITAL, C. E.; PINHEIRO, M. V. M.; BATISTA, D. S.; AZEVEDO, J. F. L.; SALDANHA, C. W.; CRUZ, A. C. F.; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. In vitro photoautotrophic potential and ex vitro photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 120: 289- 300, 2015

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, 35: 271-276, 2013.

DINAN, L. A strategy towards the elucidation of the contribution made by phytoecdysteroids to the deterrence of invertebrate predators on plants. **Journal of Plant Physiology**, 45: 296– 305, 1998.

DONG, C. J.; LI, L.; SHANG, Q. M.; LIU, X. Y.; ZHANG, Z. G. Endogenous salicylic acid accumulation is required for chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. **Planta**, 240: 687- 700, 2014.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 47: 5– 16, 2011.

ENGELMANN-SYLVESTRE, I.; ENGELMANN F. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of *Clinopodium odorum* using aluminium cryo-plates. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 51: 185– 191, 2015.

FAHY, G. M.; MAC FARLANE.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, 21: 407- 426, 1984.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; CONTIM, L. A. S.; BARBOSA, L. C. A.; STUART, J. J.; OTONI, W. C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone—a review. **Botany** 86: 978– 987, 2008.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; PUTTKAMMER, C. C.; SILVA, J. M.; DOS ANJOS, K. G.; OLIVEIRA, E. M.; GUERRA, M. P. High-efficiency cryopreservation of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures: ultrastructural characterization and morpho-physiological features. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 124: 307 - 318, 2016.

FLORES, R.; BRONDANI JÚNIOR, D.; CEZAROTTO JUNIOR, V.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. T. Micropropagation and  $\beta$ -ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 46: 210- 217, 2010.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; LEMOS, E. G. M.; FARIA, R. T.; VENDRAME, W. A. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae**, 148: 154 - 160, 2012.

GANTAIT, S.; SINNIH, U. R.; SURANTHRAN, P.; PALANYANDY, S. R.; SUBRAMANIAM, S. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. **Protoplasma**, 252: 89– 101, 2015.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROC, A. W. M.; ROOSEVELT, H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92: 1– 13, 2008.

HERINGER, A. S.; STEINMACHER, D. A.; SCHIMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; GUERRA, M. P. Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. **Protoplasma**, 250: 1185– 1193, 2013.

HIRANO, T.; YUKAWA, T.; MIYOSHI, K.; MII, M. Wide applicability of cryopreservation with vitrification method for seed of som *Cymbidium* species. **Plant Biotechnology**, 28: 99- 102, 2011.

HONG, S. R.; YIN M. H. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips rare and endangered plant *Emmenopterys henryi*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 99: 217-226, 2009.

IAREMA, L.; CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110: 227– 238, 2012.

KANG, K. A.; LEE, K. H.; CHAE, S.; ZHANG, R.; JUNG, M. S.; HAM, Y. M.; BAIK, J. S.; HYUN, J. W.; 2006. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **Journal of Cellular Biochemistry**, 97: 609- 620, 2006.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27:127-128, 1965.

KHODDAMZADEH, A. A.; SINNIHAH, U. R.; LYNCH, P.; KADIR, M. A.; KADZIMIN, S. B.; MAHMOOD, M. Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson by encapsulation-dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 107: 471- 481, 2011.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 27: 47–51, 2001.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation-environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, 10:188-204, 2010.

KULUS, D.; ZALEUWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. **Scientia Horticulturae**, 168: 88– 107, 2014.

LI, J-W.; LI, H-H.; WANG, R-R.; GAO, X-X.; WANG, Q-C. Cryopreservation for retaining morphology, genetic integrity, and foreign genes in transgenic plants of *Torenia fournieri*. **Acta Physiologiae Plantarum**, 38:8, 2016.

LI, Y.; LIU, C.; LI, T.; WANG, C.; XIAO, Y.; ZHANG, L.; JIN, D.; ZHAO, Y.; WANG, Z.; CAO, J.; HAO, L. Regulatory role of exogenous salicylic acid in the response of *Zoysia japonica* plants to freezing temperatures: a comparison with cold-acclimatisation. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 86: 277- 283, 2011.

LU, Z. W.; POPOVA, E. V.; WU, C. H.; LEE, E. J.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Cryopreservation of *Ginkgo biloba* cell culture: effect of pretreatment with sucrose and ABA. **CryoLetters**, 30: 232– 243, 2009.

MAKOWSKI, D.; TOMICZAK, K.; RYBCZYŃSKI, J. J.; MIKULA, A. Integration of tissue culture and cryopreservation methods for propagation and conservation of the fern *Osmunda regalis* L. **Acta Physiologiae Plantarum**. 39-19, 2016.

MARKOVIĆ, Z.; CHATELET, P.; PREINER, D.; SYLVESTRE, I.; KONTI, K. J.; ENGELMANN, F. Effect of shooting medium and source of material on grapevine (*Vitis vinifera* L.) shoot tip recovery after cryopreservation. **Cryoletters**, 35: 40–47, 2014.

MARTÍN, C.; CERVERA, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO M. E. Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation–dehydration cryopreservation protocol. **Journal of Plant Physiology**, 168: 158- 166, 2011.

MING-HUA, Y.; SEN-RONG. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 101:349–358, 2010.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14: 110- 121, 2012.

MOSALEEYANON, K.; CHAN-UM, S.; KIRMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO<sub>2</sub>-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, 103: 51- 63, 2004.

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

MUTLU, S.; KARADAGOGLU, O.; ATICI, O.; NALBANTOGLU, B. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. **Biologia Plantarum**, 57: 507- 513, 2013.

NASCIMENTO, E. X.; MOTA, J. H.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado **Ciência e Agrotecnologia**, 31: 742– 730, 2007.

O'BRIEN, T. P., MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981.

PATHIRANA, R.; McLACHLAN, A.; HEDDERLEY, D.; PANIS, B. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. **Acta Physiologiae Plantarum**, 38:12, 2016.

PORNCHUTI, W.; THAMMASIRI, K. Cryopreservation of protocorms of *Dendrobium virgineum* Rchb.f. **Acta Horticulturae**, 788: 63- 68, 2008.

REPKA, V. Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. **Biologia Plantarum**, 44: 555 - 565, 2001.

RHARRABE, K.; BOUAYAD, N.; SAYAH, F. Effects of ingested 20-hydroxyecdysone on development and midgut epithelial cells of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 93: 112- 119, 2009.

SAKAI, A. Cryopreservation of germoplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. **Cryopreservation of plant germoplasm**, Berlin, Heierlberg, New York, 1995. p.53-69.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.)Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 110: 413–422, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; CRUZ, A. C. F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 49: 433– 444, 2013.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D. I.; CAVETTE, P. C.; DETMANN, K. S. C.; TANAKA, F. A. O.; DIAS, L. L. C.; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 118: 87–99, 2014.

SAN JOSÉ, M. C.; CORREDOIRA, E.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C. Cryopreservation of somatic embryos of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and confirmation of ploidy stability by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 123: 1-11, 2015.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12: 70- 94, 2000.

SARASAN, V.; KITE, G. C.; SILESHI, G. W.; STEVENSON, P. C. Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. **Plant Cell Reports**, 30: 1163– 1172, 2011.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**, 3.ed. Brasília: Embrapa, 2014. p. 179-236.

SEN-RONG, H.; MING-HUA, Y. A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhenas phodeloides* Bunge by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109: 287-296, 2012.

SERRA, A. P.; MARCHETTI, M. E.; VIEIRA, M. C.; SILVA, M. A. G.; ROSA JUNIOR, E. J.; NASCIMENTO, J. M.; GUEDES, E. M. S. Produção de biomassa e absorção de N e P pela *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função de doses de N e P em condições de casa de vegetação, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13: 265 – 270, 2011.

SERSHEN, P.B.; PAMMENTER, N. W.; WESLEY-SMITH, J. The effects of various parameters during processing for cryopreservation on the ultrastructure and viability of recalcitrant zygotic embryos of *Amaryllis belladonna*. **Protoplasma**, 249:155 - 169, 2012.

SIMIONE, F. P. **Thermo Scientific Nalgene and Nuc Cryopreservation Guide**. Disponível em :

<[www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation\\_Technical\\_Manual.ashx](http://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx)> (2013). Acesso em: 17 de abril de 2016.

SISUNANDAR, S.; RIVAL, A.; TURQUAY, P.; SAMOSIR, Y.; ADKINS, S. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. **Planta**, 232: 435– 447, 2010.

SUZUKI, M.; ISHIKAWA, M.; OKUDA, H.; NODA, K.; KISHIMOTO, T.; NAKAMURA, T.; OGIWARA, I.; SHIMURA, I.; AKIHAMA, T. Physiological changes in gentian axillary buds during two-step preculturing with sucrose that conferred high levels of tolerance to desiccation and cryopreservation. **Annals of Botany**, 97: 1073–1081, 2006.

SUZUKI, M.; TANDON P.; ISHIKAWA M.; TOYOMASU T. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. **Plant Biotechnology**, 2: 123- 131, 2008.

TAŞGIN, E.; ÖKKEŞ, A.; NALBANTOĞLU, B.; POPOVA, L. P. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. **Phytochemistry**, 67: 710- 715, 2006.

TOWILL, L. E. 2002. Cryopreservation of plant germplasm. In: Towill, L.E., Bajaj, Y.P.S. **Cryopreservation of Plant Germplasm II**. Springer-Verlag, Berlin, 2002. p. 3–21.

VENDRAME, W. A; FARIA, R. T. Phloroglucinol enhances recovery and survival of cryopreserved *Dendrobium nobile* protocorms. **Scientia Horticulturae**, 128: 131- 135, 2011.

XIAO Y.; NIU G.; KOZAI T. Development and application of photoautotrophic micropropagation systems. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 105:149–158, 2011.

YIN, M., HONG, S. Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 98: 179 – 185, 2009.

ZHANG, J.; HUANG, B.; ZHANG, X. N.; VOLK, G. M.; ZHOU, Y. C.; CHEN, X. L. Identification of a highly successful cryopreservation method (droplet-vitrification) for petunia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 51: 445 – 451, 2015.

## CAPÍTULO II:

### **Propagação *in vitro* de *Zingiber spectabile* Griff. em biorreatores de imersão temporária**

**Resumo-** A tendência mundial da propagação vegetativa *in vitro*, tem apontado para o uso de meios de cultura líquidos em biorreatores de imersão temporária. O objetivo desse estudo foi verificar a capacidade de multiplicação e o desenvolvimento de brotos de *Zingiber spectabile* Griff. em biorreatores de imersão temporária RITA<sup>®</sup>, utilizando duas fontes de citocinina e duas concentrações de sacarose. Brotos de *Z. spectabile* foram inoculados em biorreatores. À cada biorreator foram adicionados 250 mL de meio de cultura constituído por sais e vitaminas MS, acrescidos de diferentes fontes de citocinina [6,66 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 6,66 µM de 6-(3- hidroxibenzilamino) purina (Meta-Topolina)] e diferentes concentrações de sacarose, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>. O maior número de brotos foi encontrado no tratamento utilizando m- Top e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Maiores massas seca e fresca foram encontradas em tratamentos utilizando BAP e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Não houve diferenças significativas para pigmentos fotossintéticos e índice estomático, todavia observou-se diferenças anatômicas entre os tratamentos. Nos testes histoquímicos foi possível observar, em todos os tratamentos, presença de corpos proteicos, corpos lipídicos nas células epidérmicas e no interior dos idioblastos. Na análise de perfil hormonal, houve maior biossíntese de jasmonato no tratamento sem adição de citocinina, sendo que os maiores níveis de ABA e etileno foram encontrados no tratamento utilizando m-Top e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e BAP e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente. Houve correlação significativa entre as massas seca e fresca, números de folhas e de brotos, ABA e zeatina, auxina e zeatina, zeatina e SA. A utilização das duas fontes de citocinina foi eficiente na promoção do crescimento e do desenvolvimento das brotações. Na utilização de BAP, os melhores resultados foram no tratamento utilizando 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, ao passo que, com a utilização de m-Top, os melhores resultados foram encontrados utilizando 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

**Palavras-chave:** Citocininas, gengibre ornamental, cultivo *in vitro*, RITA<sup>®</sup>, perfil hormonal.

## CHAPTER II

### ***In vitro* propagation of *Zingiber spectabile* Griff. in immersion temporary bioreactors**

**Abstract-** The world trend in *in vitro* vegetative propagation, has pointed towards the use of liquid culture media in a temporary immersion bioreactor. The aim of this study was to verify the multiplication of capacity and the development of *Zingiber spectabile* Griff. shoots in temporary immersion bioreactor RITA<sup>®</sup>, using two sources of cytokinins and two concentrations of sucrose. Shoots *Z. spectabile* were excised from plants grown *in vitro* approximately 30 days of *in vitro* culture and cultured in bioreactors. To each bioreactor were added 250 mL of culture medium consisting of MS salts and different sources of cytokinins [6.66  $\mu$ M 6-benzylaminopurine (BAP) and 6.66 mM of 6-(3-hydroxybenzylamino) purine (Meta-Topoline)] and different concentrations of sucrose, 15 and 30 g L<sup>-1</sup>. The highest number of shoots was found in treatment using m- Top and 15 g L<sup>-1</sup> sucrose. Further fresh and dry pasta were found in treatments with BAP and 30 g L<sup>-1</sup> sucrose. There were no significant differences in photosynthetic pigments and stomatal index, however observed anatomical differences between treatments. In histochemical tests was observed in all treatments, the presence of protein bodies, lipid bodies in epidermal cells and on idioblasts. In the hormonal profile analysis, was greater jasmonate biosynthesis in the treatment without added cytokinin, with the highest levels of ABA and ethylene were found in the treatment using m-Top and 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and BAP and 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, respectively. There was a significant correlation between fresh and dry mass, number of leaves and shoots, ABA and zeatin, auxin and zeatin, zeatin and SA. The use of two sources of cytokinin was effective in promoting growth and development of shoots of *Zingiber spectabile*. When using BAP, the best results were to treat using 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, where as, with the use of m-top, best results were found using 15 g L<sup>-1</sup> sucrose.

**Key words:** Cytokinin, ornamental ginger, *in vitro* culture, RITA<sup>®</sup>, hormonal profile.

## 1. INTRODUÇÃO

*Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae), conhecida popularmente como gengibre ornamental, xampu, maracá, cotonete de elefante e sorvetão, apresenta elevado interesse comercial devido o uso das flores na decoração de ambientes e das plantas no paisagismo (Nery et al., 2015). Além disso, as folhas podem ser utilizadas para acentuar o sabor dos alimentos, e os rizomas são utilizados na medicina tradicional, no tratamento de inflamações, como germicida, estimulante, tônico, tratamento de câncer e antioxidante, por apresentar vários flavonoides e sesquiterpenos (Sivasothy et al., 2012).

O cultivo de *Z. spectabile* pode ser realizado em campo, casa de vegetação ou *in vitro* (França et al., 2010). A propagação vegetativa *in vitro* tem evidenciado resultados satisfatórios para produção comercial de várias espécies, obtendo-se mudas com elevada qualidade, livre de pragas e doenças, característica genética uniforme e independência de sazonalidade inerente a cada cultura (Flores et al., 2010). Nesse contexto, a metodologia tradicional de cultivo *in vitro*, baseia-se em cultivos e subcultivos em frascos, com baixo número de plântulas por frasco (Teixeira, 2002), sendo a taxa de regeneração afetada, essencialmente pelo tipo e pela concentração dos fitorreguladores utilizados, principalmente por citocininas, que agem diretamente na divisão e expansão celular (Aremu et al., 2012).

A seleção da citocinina para o uso em cultura de tecidos é determinada pela sua eficiência na multiplicação dos explantes, desenvolvendo plantas normais e com capacidade de fácil aclimatização. Atualmente, a benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais amplamente utilizada na micropropagação. Entretanto, Dimitrova et al. (2016) descreveram alguns resultados que indicam que a utilização de metatopolina (m-Top) poderia gerar impactos positivos na micropropagação de diversas espécies de plantas.

Por outro lado, o uso de meio de cultura líquido vem sendo considerado ideal para a micropropagação (Etienne & Berthouly, 2002; Aragón et al., 2014), uma vez que no sistema de imersão temporária ocorre o contato de curta duração entre o meio de cultura líquido e o explante, renovando o ambiente interno do equipamento e garantindo o fornecimento adequado de nutrientes. Desse modo, o

maior contato das plantas com o meio de cultura aumenta consideravelmente a absorção (Etienne & Berthouly, 2002; Quiala et al., 2012; Vidal et al., 2015).

Os biorreatores de imersão temporária-RITA<sup>®</sup> possuem um sistema de transferência de meio líquido, ficando em contato com os explantes por período pré-determinado e sem a necessidade de renovação de nutrientes (Ramos-Castellá et al., 2014). Esse sistema tem sido classificado como o mais eficiente, sendo considerado uma alternativa para otimização dos processos de multiplicação *in vitro*, com automatização dos processos de multiplicação e redução de custos (Gomes et al., 2016; Gutiérrez et al., 2016).

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi verificar a capacidade de multiplicação e o desenvolvimento de brotos de *Zingiber spectabile* em biorreatores de imersão temporária RITA<sup>®</sup> utilizando duas fontes de citocininas e duas concentrações de sacarose.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Brotações de *Zingiber spectabile* previamente estabelecidas *in vitro*, foram subcultivadas a cada 30 dias, em meio de cultura constituído por sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), geleificado com 6,5 g de ágar (Merck®, Alemanha), sendo o pH do meio ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121 °C, durante 15 minutos. A cultura foi mantida a 25  $\pm$  2 °C sob irradiância de 41  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

### 2.2 Multiplicação de segmentos nodais de *Zingiber spectabile* em biorreatores de imersão temporária do tipo RITA®

Brotos de *Zingiber spectabile*, com (~ 1- 2 cm de comprimento), foram excisados de vitroplantas com aproximadamente 30 dias de cultivo e inoculados em biorreatores de imersão temporária, do tipo RITA®. A cada biorreator foi adicionado 250 mL de meio de cultura constituído por sais e vitaminas MS, acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, diferentes fontes de citocinina [6,66  $\mu$ M de 6-benzilaminopurina (BAP) e 6,66  $\mu$ M de 6-(3-hidroxibenzilamino) purina (Meta- Topolina)] e diferentes concentrações de sacarose, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121 °C, durante 15 minutos. Os explantes foram mantidos a 25  $\pm$  2 °C, fotoperíodo 16 horas, sob irradiância de 36  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, por 45 dias.

### 2.3 Parâmetros de crescimento

Aos 45 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes características: altura de planta (cm), número de brotos, número de folhas, enraizamento, massa fresca (g), e massa seca (g), essa última determinada após peso constante, após 48h em estufa a 70 °C.

## 2.4 Caracterização anatômica, histoquímica e índice estomático das folhas

Para avaliação anatômica e histoquímica, foi utilizado a porção média de folhas completamente expandidas, fixando-as em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), composta por: 2,5% de glutaraldeído, 4,0% de paraformaldeído, 3,0% de sacarose, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, em tampão de cacodilato a 0,1M, pH 6,8 permanecendo refrigerado. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais com 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomato rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA). Para caracterização estrutural, as amostras foram coradas em azul de toluidina (pH 3,2) por 15 minutos (O'Brien & McCully, 1981). Para caracterização histoquímica, cortes transversais foram submetidos aos testes de sudan black B (Pearse, 1972) e vermelho neutro (Kirk, 1970) para evidenciar corpos lipídicos; NADI para evidenciar óleos essenciais e/ou óleos-resina (David & Carde, 1964); ácido periódico/ reagente de Schiff (PAS), para caracterizar a presença de amido, mucilagens e polissacarídeos neutros (Feder & O'Brien, 1968) e xilidine ponceau (XP), para caracterizar proteínas totais (Vidal, 1977). As lâminas dos referidos testes foram montadas em Permount® SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific), e as imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic, no Laboratório de Anatomia Vegetal/ UFV.

Para a determinação do índice estomático foi realizada a técnica de diafanização, segundo a metodologia de Foster (1950), com modificações, onde folhas inteiras foram diafanizadas com solução de NaOH 10%, lavadas com água destilada e coradas com fucsina alcoólica. Cada folha diafanizada foi montada em lâmina com gelatina glicerinada e lutadas com esmalte incolor, com o objetivo de evitar eventuais distorções dimensionais, uma vez que, as amostras se apresentam planificadas.

## 2.5 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para a determinação dos pigmentos fotossintéticos, clorofila *a* e *b* e carotenoides, seguiu-se a metodologia descrita por Wellburn (1994). Dessa forma, cinco discos foliares com 6 mm de diâmetro cada foram introduzidos em tubos contendo 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com CaCO<sub>3</sub> (Santos et al., 2008), onde permaneceram sob ausência total de luz por 48 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se a leitura das absorvâncias das amostras em espectrofotômetro Genesys 10 UV/ Visible (Thermo Scientific, Madison, WI), utilizando cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. Da mesma forma, os comprimentos de ondas e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas *a* e *b* e carotenoides também foram baseados na metodologia de (Wellburn, 1994).

## 2.6 Perfil hormonal

Foram utilizadas parte aérea e radicular para quantificação dos níveis dos hormônios: Jasmonato, Giberelina 4 (GA4), Zeatina, Metil Jasmonato (MeJa), Ácido Salicílico (AS), Etileno (através do ácido 1-carboxílico-1aminociclopropano - ACC), Auxina (AIA) e Ácido Abscísico (ABA). Para a extração utilizou-se a metodologia descrita por Muller & Munné-Bosch (2011), com modificações. Cerca de 110 mg de tecido fresco foi macerado em nitrogênio líquido seguida da adição de 400 µL de solução extratora (metanol: isopropanol: ácido acético; 20: 79: 1). As amostras foram agitadas em vortex (4 vezes por 20 segundos), sonicadas (5 minutos) e mantidas no gelo (30 minutos). Após centrifugação (13000 g, 10 min a 4 °C), 350 µL do sobrenadante foram coletados para um novo tubo, repetindo o processo de extração com o pellet resultante e, ao final, uniu-se os sobrenadantes. Uma última centrifugação (20000 g, 5 min a 4 °C) foi realizada para remoção de resíduos de tecido em suspensão.

Posteriormente, 5 µL do extrato foi injetado automaticamente no sistema LC-MS/MS utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 µm, 2.1 x 50 mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB-C18, 1.8 µm (Agilent). A fase móvel consistiu em: (A) ácido

acético 0,02% em água e (B) ácido acético 0,02% em acetonitrila em um gradiente de tempo/ %B de: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. Um fluxo de 0,3 mL/ minuto e temperatura da coluna de 23 °C foram utilizados. No espectrômetro de massa foi utilizada a fonte de ionização ESI (Electrospray Ionisation) com as seguintes condições: temperatura do gás de 300° C, fluxo de nitrogênio de 10 L/min, pressão do nebulizador de 35 psi e tensão capilar de 4000 V.

Citocinina, AIA e ACC foram escaneados no modo positivo, enquanto ABA, AS, GA4 e JA no modo negativo. Uma curva de calibração (0,1 ng a 200 ng) utilizando os respectivos padrões de cada hormônio foi feita para a obtenção da quantificação absoluta. Os dados gerados foram analisados no software MassHunter Workstation para obtenção da área dos picos de cada hormônio nas amostras e os resultados foram expressos em ng g<sup>-1</sup> de tecido fresco.

Da mesma forma, foi realizado o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis de crescimento e os fitormônios, com objetivo de averiguar a tendência de influência que determinado fitormônio possui nos parâmetros de crescimento.

## 2.7 Delineamento Experimental

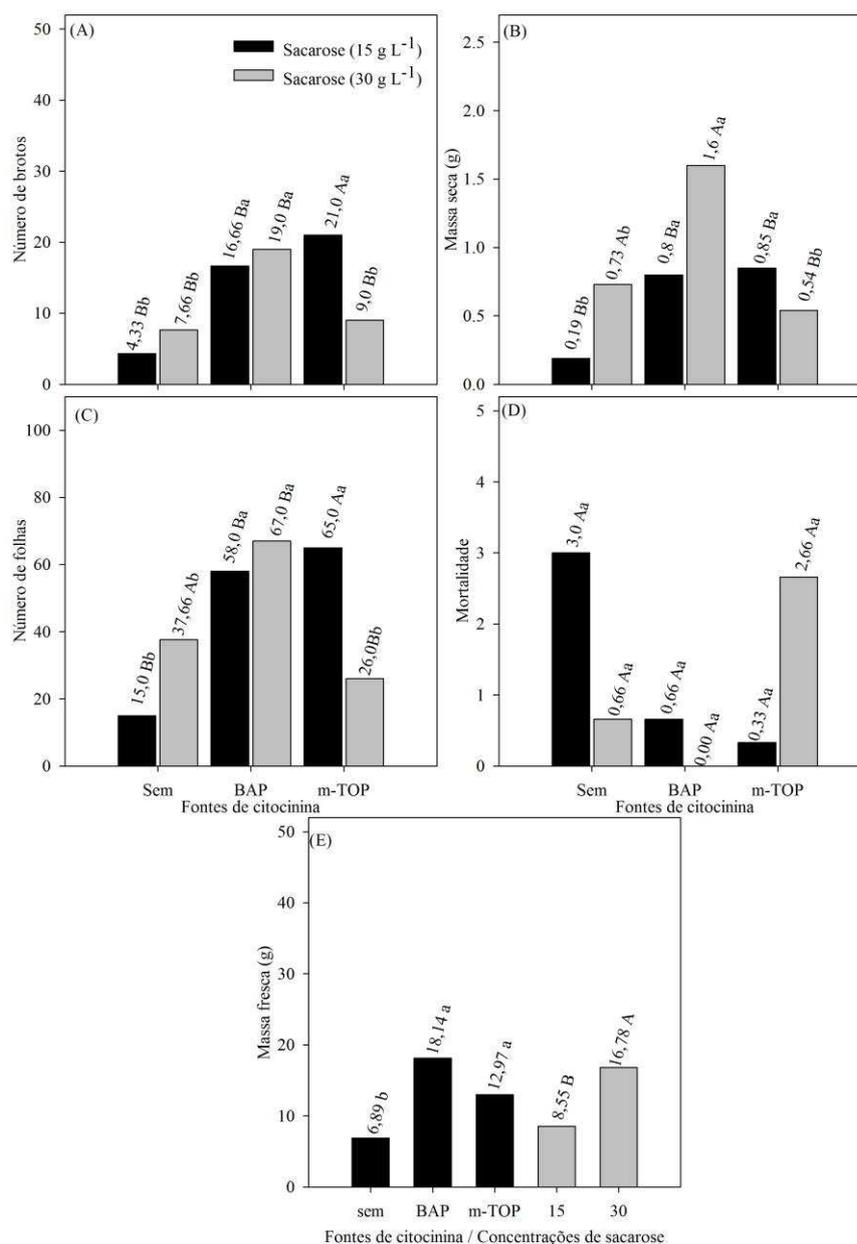
Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com arranjo fatorial 3 x 2, sendo duas fontes de citocinina, BAP e m-Top, e um controle, caracterizado por ausência de citocinina ao meio de cultura; e duas concentrações de sacarose, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>, organizados nos seguintes tratamentos: T1: sem citocinina e 15 g L<sup>-1</sup> sacarose; T2: sem citocinina e 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; T3: 6,66 µM BAP e 15 g L<sup>-1</sup> sacarose; T4: 6,66 µM BAP e 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; T5: 6,66 µM M-Top e 15 g L<sup>-1</sup> sacarose; T6: 6,66 µM M-Top e 30 g L<sup>-1</sup> sacarose. Cada tratamento foi composto por cinco repetições, sendo cada repetição composta por um biorreator RITA<sup>®</sup> contendo cinco explantes.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05). Os dados que não seguiram as pressuposições de normalidade foram transformados para  $\sqrt{x}$  ou  $\sqrt{x+0,5}$ . As análises foram realizadas pelo programa Genes (Cruz, 2013).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Parâmetros de crescimento**

Os parâmetros de crescimento número de brotos, massa seca e número de folhas apresentaram interações significativas entre concentrações de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e fontes de citocininas (ausência, BAP e m-TOP). Para a massa fresca, os fatores sacarose e fontes de citocinina atuaram de forma independente, e, para a mortalidade de plantas, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 1).



**Figura 1.** Parâmetros de crescimento de plantas de *Zingiber spectabile*, micropropagadas em biorreatores RITA<sup>®</sup>, por 45 dias, com diferentes concentrações de sacarose e fontes de citocinina em meio de cultura. Número de brotos (A); Massa seca (g) (B); Número de folhas (C); Mortalidade (D); Massa fresca (g) (E). (A, B, C, D) médias na interação concentração de sacarose x fontes de citocinina: letras maiúsculas correspondem ao fator sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e letras minúsculas correspondem ao fator citocinina (0, BAP, m- Top), diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (E): médias dos fatores concentração de sacarose e fontes de citocinina. Letras maiúsculas iguais para sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e minúsculas para o citocinina (0, BAP, m-Top), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

As variáveis número de brotos, massa seca e número de folhas apresentaram as maiores médias nos tratamentos com BAP nas concentrações

de 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e no tratamento com m-Top na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Em relação ao número de brotos, o tratamento com BAP sob 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, apresentou aumento de 12,33 e 11,34 brotos, respectivamente, e, para m-Top sob 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose houve aumento de 16,33 brotos quando comparado esses tratamentos com a ausência de citocinina nessas mesmas concentrações de sacarose.

Para a massa seca, o maior acúmulo ocorreu no tratamento de BAP sob 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com incremento equivalente ao dobro da massa seca das plantas cultivadas com BAP sob 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e m-Top sob 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, que estão entre os tratamentos que promoveram os maiores ganhos de biomassa.

O número de folhas nos tratamentos com BAP sob 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e m-Top sob 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram médias superiores a 50 folhas, diferindo dos demais tratamentos, destacando-se o tratamento com BAP sob 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose que apresentou valor médio igual a 67 folhas.

Para a variável massa fresca, as citocininas BAP e m-TOP, induziram maior acúmulo de biomassa das plantas que apresentaram incremento de 11,25 e 5,81 g, respectivamente, assim como, a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose promoveu maior acúmulo de biomassa fresca, na qual, houve incremento de 50% em relação ao tratamento com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Coletivamente, o meio de cultivo contendo BAP acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou os melhores parâmetros de crescimento *in vitro* para *Zingiber spectabile*.

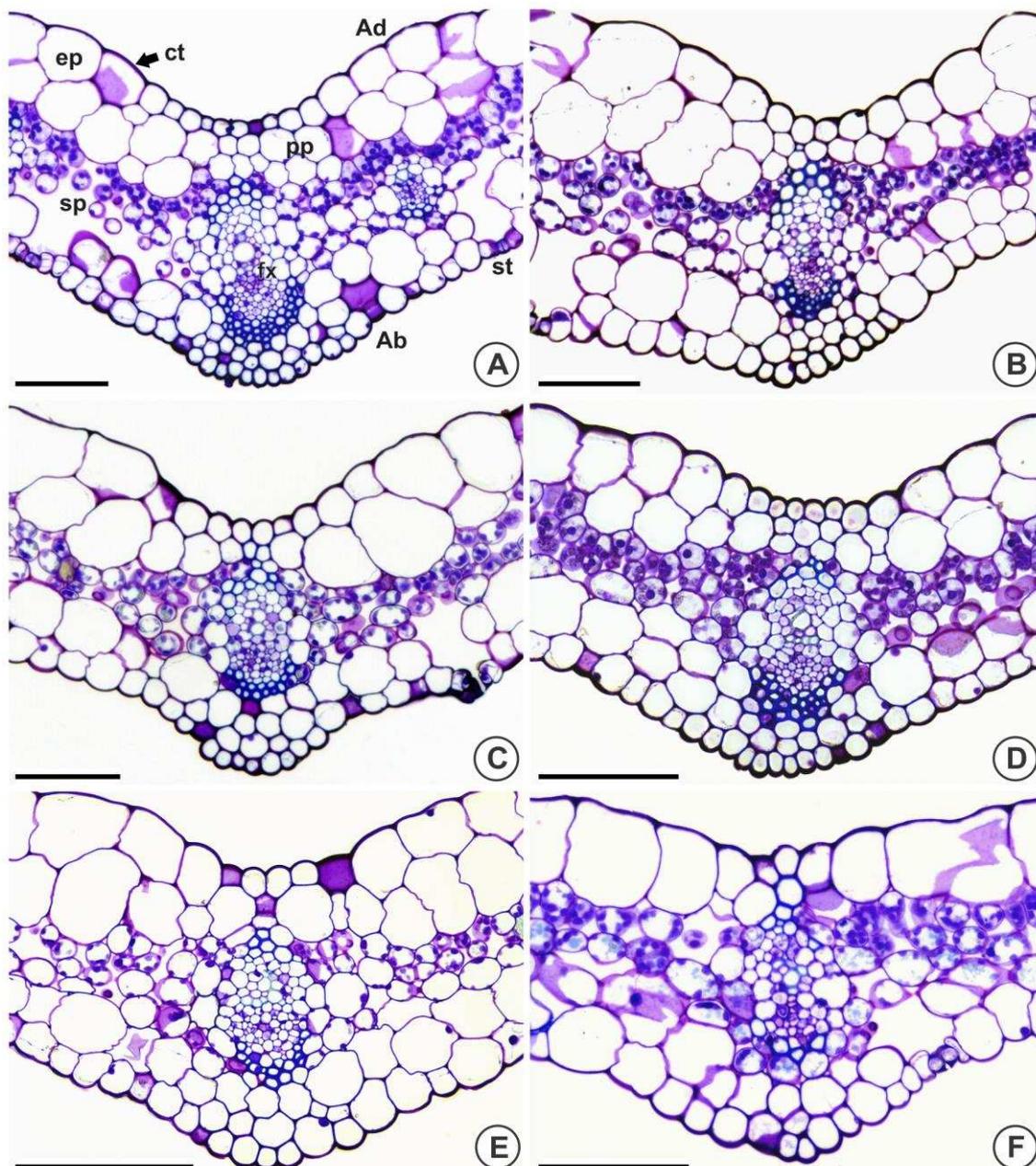
### **3.2 Análise anatômica, histoquímica e índice estomático das folhas de *Zingiber spectabile***

Na avaliação estrutural, por meio do azul de toluidina, observaram-se cutícula espessa, células epidérmicas da região adaxial e abaxial organizadas, parênquimas paliçádico e lacunoso bem definidos nas folhas de *Zingiber spectabile*. Além disso, diferenças anatômicas foram observadas entre os tratamentos.

Na concentração de sacarose de 15 g L<sup>-1</sup>, independente da fonte de citocinina (BAP e m-Top), houve melhor organização do feixe vascular e maior

vascularização (Figura 2A, 2C, 2E), quando comparados com os tratamentos de 30 g L<sup>-1</sup> (Figura 2B, 2F), exceto para o BAP sob 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 2D).

Para os tratamentos sem adição de citocinina (Figura 2A, 2B) e com adição de m-Top (Figura 2E, 2F) notou-se elevado número de espaços intercelulares na região do mesofilo, maior desorganização do parênquima clorofiliano e nervura mediana menos desenvolvida quando comparada com os tratamentos contendo BAP (Figura 2C, 2D). Do mesmo modo, nos tratamentos com adição de m-Top também se observou menor espessamento de parede celular das células que compõem o mesofilo (Figura 2E, 2F).

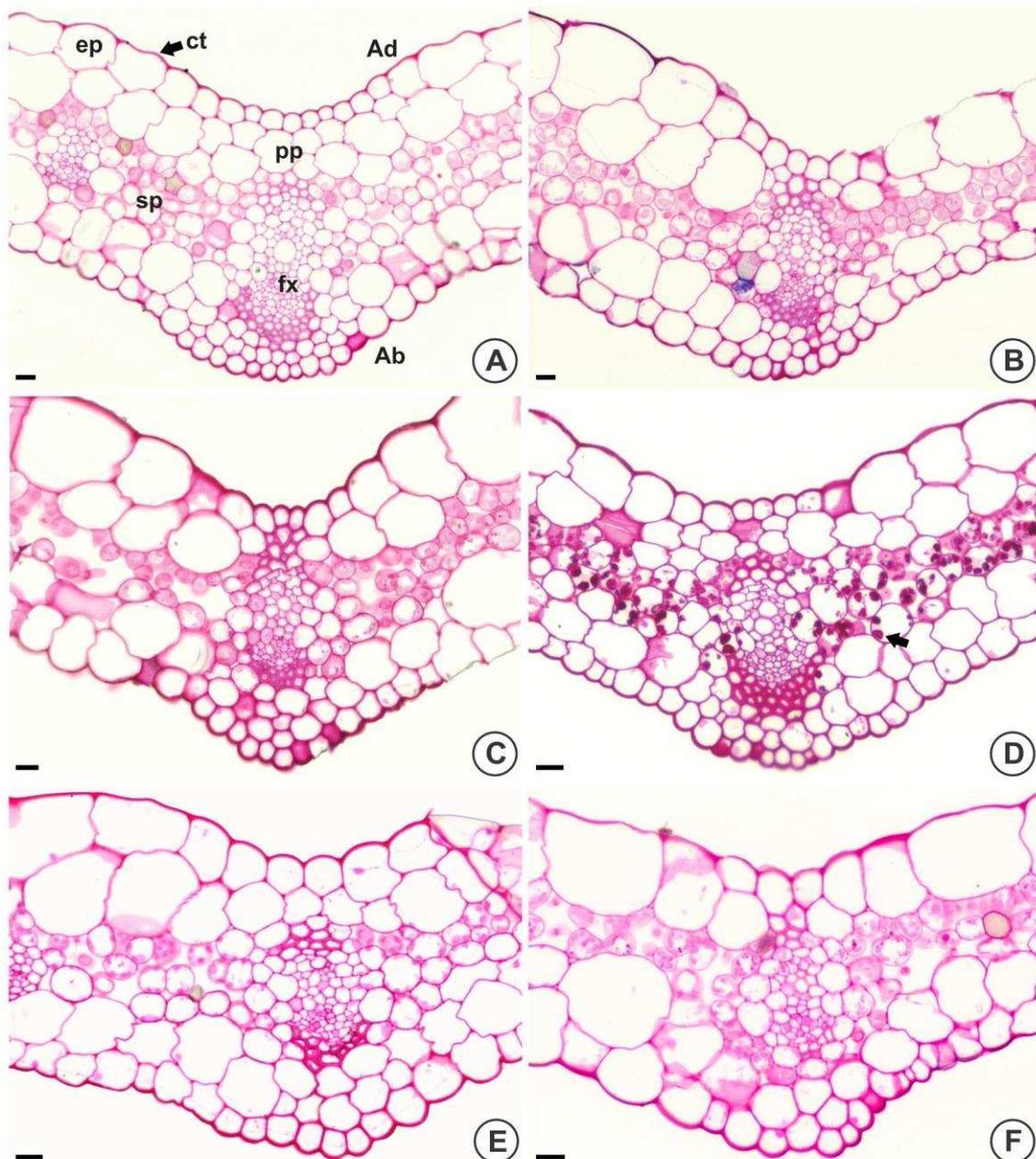


**Figura 2.** Secções transversais da porção mediana de folhas de *Zingiber spectabile* micropropagadas em biorreatores RITA<sup>®</sup> por 45 dias com diferentes concentrações de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e fontes de citocinina (0, BAP e M-Top) em meio de cultura. **(A)** sem adição de citocinina + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(B)** sem adição de citocinina + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(C)** BAP + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(D)** BAP + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(E)** m- Top + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(F)** m- Top + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; ct: cutícula; ep: epiderme; pp: parênquima paliçádico; sp: parênquima lacunoso; st: estômato; fx: feixe vascular. Barra: 20 μm.

Os testes histoquímicos realizados indicaram reação positiva para o corante PAS, sendo possível observar diferenças entre os tratamentos para esse teste. Foram positivos também para xylydine ponceau (XP), sudan black, vermelho

neutro e NADl, mas sem diferenças histoquímicas entre os tratamentos para esses testes.

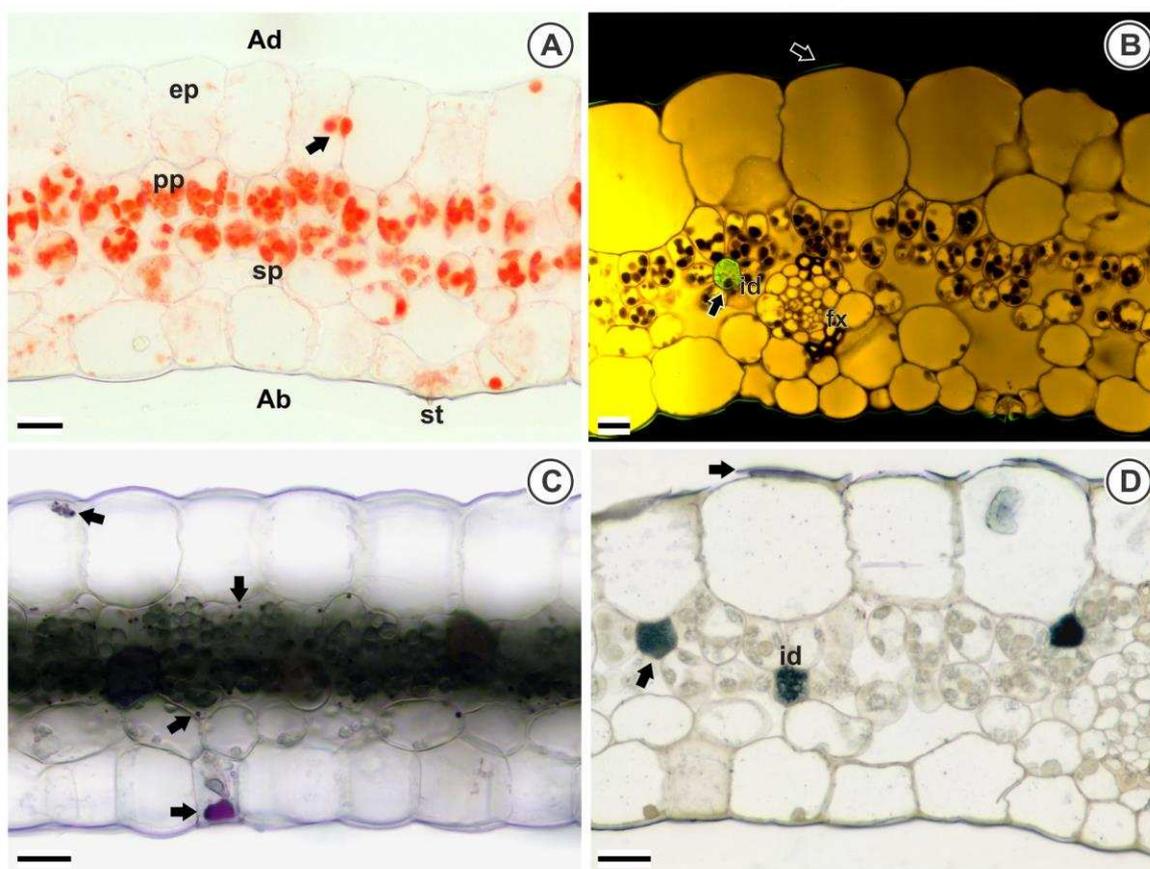
Por meio do teste de PAS (Figura 3), observou-se reação mais acentuada de carboidratos em células epidérmicas e parenquimáticas dos tratamentos com duas concentrações de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e adição de BAP, como também células xilemáticas com maior espessamento de parede celular e presença de fibras xilemáticas densas, indicando desenvolvimento do sistema vascular (Figura 3C, 3D). O tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose sem adição de citocinina apresentou maior espessamento de células xilemáticas quando comparado ao tratamento com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose sem adição de citocinina (Figura 3A, 3B). Da mesma forma, o tratamento com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e m-Top apresentou maior espessamento das células xilemáticas em relação ao tratamento com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e m-Top (Figura 3E, 3F).



**Figura 3.** Teste histoquímico- PAS para detecção de polissacarídeos neutros em secções transversais da porção mediana de folhas de *Zingiber spectabile* micropropagadas em biorreatores RITA®, por 45 dias, com diferentes concentrações de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e fontes de citocinina (0, BAP e M-Top) em meio de cultura. **(A)** sem adição de citocinina + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(B)** sem adição de citocinina + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(C)** BAP + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(D)** BAP + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(E)** m- Top + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(F)** m- Top + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; ct: cutícula; ep: epiderme; pp: parênquima paliçádico; sp: parênquima lacunoso; fx: feixe vascular. Barra: 20 μm.

O teste XP evidenciou corpos proteicos nas células epidérmicas e mesofílicas de todos os tratamentos (Figura 4A). Já o teste com sudan black B

evidenciou corpos lipídicos no interior dos idioblastos e na cutícula em todos os tratamentos (Figura 4D), sendo confirmado esse resultado pelo teste com vermelho neutro (Figura 4B). Através do teste de NADI, foi constatada a presença de misturas de óleos essenciais e óleos-resinas em células da epiderme e do mesófilo para todos os tratamentos (Figura 4C).



**Figura 4.** Análise histoquímica em secções de folhas de plantas de *Zingiber spectabile* micropropagadas em biorreatores RITA<sup>®</sup> por 45 dias, com diferentes concentrações de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e fontes de citocinina (0, BAP e M-Top) em meio de cultura. **(A)** Teste XP (xylidine ponceau) evidenciando corpos proteicos corados de vermelho, para todos os tratamentos; **(B)** Teste de vermelho neutro evidenciando corpos lipídicos corados de verde no interior dos idioblastos e na cutícula, para todos os tratamentos; **(C)** Reagente de NADI corando de violeta misturas de óleos essenciais e óleos-resinas nas células epidérmicas e mesofílicas, para todos os tratamentos; **(D)** sudan black B evidenciando corpos lipídicos corados de azul no interior dos idioblastos e na cutícula, para todos os tratamentos. Ad: face adaxial da epiderme; Ab: face abaxial da epiderme; ep: epiderme; pp: parênquima paliçádico; sp: parênquima lacunoso; st: estômato; fx: feixe vascular; id: idioblastos. Barra: 20 µm.

Em relação ao índice estomático, não houve diferença estatística entre os tratamentos na face adaxial e abaxial, mas comparando as duas faces, a face

abaxial apresentou índice de 8,20%, diferindo estatisticamente da face adaxial que apresentou índice de 0,79%. O tratamento controle sob 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, BAP sob 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e m-Top sob 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram para a face adaxial média de 1,04; 0; 0; 0; 1,03; 2,08%, respectivamente, e, para a face abaxial a média foi de 8,10; 9,06; 6,82; 8,52; 6,69 e 9,41%, respectivamente (dados não mostrados).

### **3.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos clorofilas a e b e carotenoides**

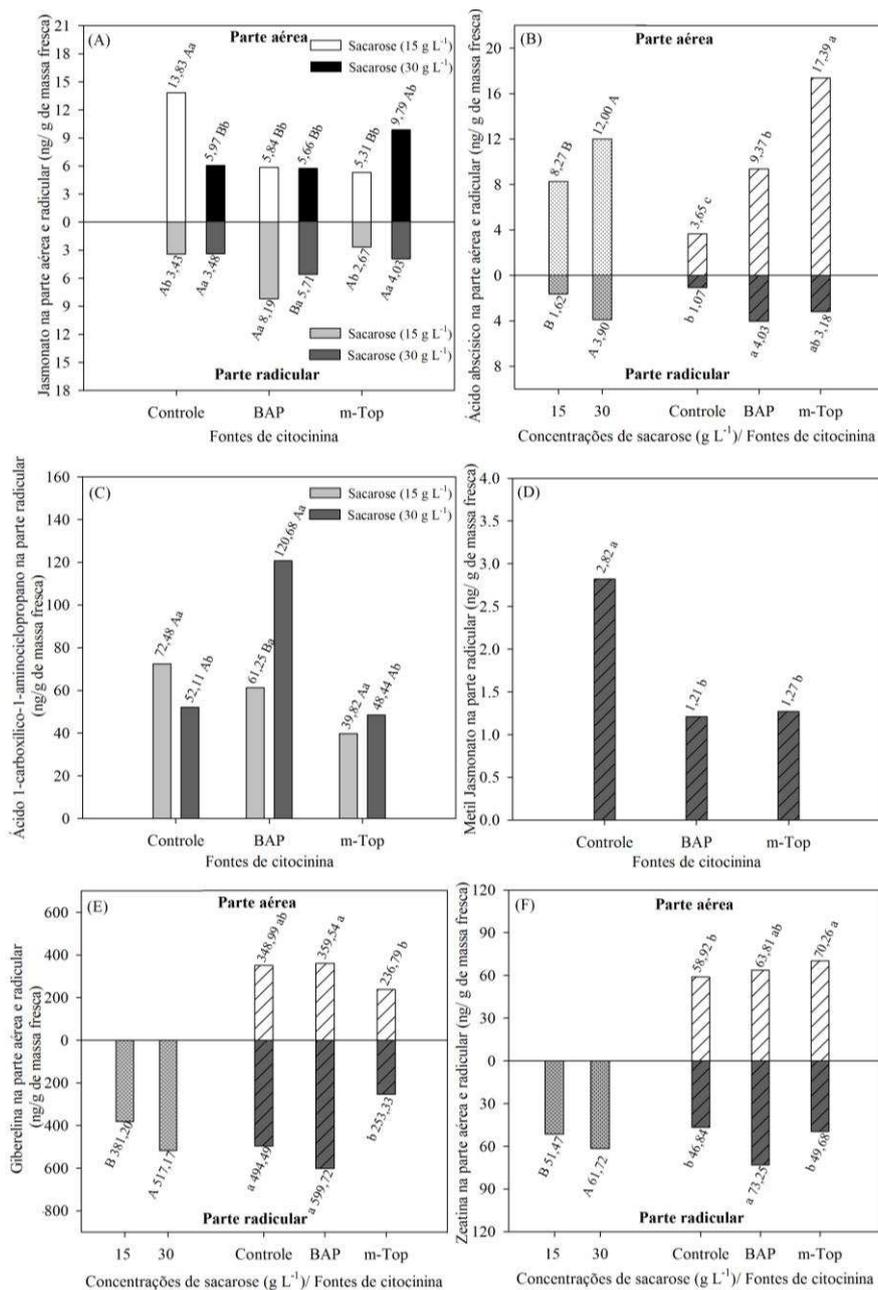
Para os pigmentos fotossintéticos clorofilas a e b e carotenoides não houve diferença estatística entre os tratamentos. Para o tratamento controle sob 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, BAP sob 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e m-Top sob 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose as médias de clorofila a variaram de 11,08 a 18,35 µg/cm<sup>2</sup>, em relação à clorofila b, as médias variaram de 2,96 a 4,54 µg cm<sup>-2</sup>, e, para carotenoides a variação foi de 2,26 a 3,61 µg cm<sup>-2</sup> entre os tratamentos.

### **3.4 Perfil hormonal**

Diferentes teores de fitorreguladores foram observados entre os tratamentos, evidenciando uma complexa sinalização e modulação no cultivo *in vitro* de *Zingiber spectabile* (Figura 5). Para o jasmonato foi observada interações significativas entre doses de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e fontes de citocininas (ausência, BAP e m-Top) na parte aérea e radicular (Figura 5A), bem como, também foi observada interações significativas entre esses fatores para o ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor do etileno, mas somente na parte radicular.

Em relação ao ácido abscísico, os fatores sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e fontes de citocinina (ausência, BAP e m-Top) atuaram de forma independente na parte aérea e radicular, e, para o metil jasmonato, apenas o fator fontes de citocininas foi significativo para a parte radicular.

Para giberelina e zeatina, somente as fontes de citocinina foram significativas para a parte aérea, e, para a parte radicular, os fatores fontes de citocinina e concentrações de sacarose também foram significativos, mas atuaram de forma independente.



**Figura 5.** Níveis de fitormônios em parte aérea e radicular de plantas de *Zingiber spectabile*, micropropagadas em biorreatores RITA<sup>®</sup> por 45 dias, com diferentes concentrações de sacarose e fontes de citocinina em meio de cultura. **(A)** níveis de jasmonato em parte aérea e radicular; **(B)** níveis de ácido abscísico em parte aérea e radicular; **(C)** níveis de etileno em parte radicular; **(D)** níveis de metil jasmonato em parte radicular; **(E)** níveis de giberelina em parte aérea e radicular; **(F)** níveis de zeatina em parte aérea e radicular; **(A, C)** médias na interação concentração de sacarose x fontes de citocinina parte aérea e radicular: letras maiúsculas correspondem ao fator sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e letras minúsculas correspondem ao fator citocinina (0, BAP, m- Top), diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; **(B, D, E, F)** médias dos fatores concentração de sacarose e fontes de citocinina parte aérea e radicular. Letras maiúsculas iguais para sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e minúsculas para citocinina (0, BAP, m- Top), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o jasmonato na parte aérea, os tratamentos sem adição de citocinina sob 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e m-Top sob 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram os maiores níveis, com valor médio igual a 13,83 e 9,79 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca, respectivamente. Para a parte radicular, os maiores níveis de jasmonato foram encontrados no tratamento contendo BAP e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e os menores níveis no tratamento com m-Top com 15 g L<sup>-1</sup>, com 2,31 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca (Figura 5A).

Em relação ao ácido abscísico (ABA) na parte aérea, os tratamentos com as citocininas BAP e m-Top diferiram entre si e, ambos diferiram do tratamento controle, com valores médios de 9,37 e 17,39 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca, respectivamente. Para as concentrações de sacarose 15 e 30 g L<sup>-1</sup>, os maiores teores de ácido abscísico foram observados na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> que apresentou média de 12 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca. Na parte radicular, o teor de ácido abscísico no tratamento com BAP não diferiu de m-Top, mas diferiu do tratamento controle, e, para as concentrações de sacarose, a resposta foi semelhante a parte aérea, na qual, os maiores níveis de ácido abscísico foram observados na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 5B).

O ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor do etileno, apresentou maiores níveis no tratamento BAP na concentração de sacarose de 30 g L<sup>-1</sup>, com média de 120,68 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca na parte radicular. Quando observado os tratamentos sem adição de citocinina, os maiores níveis de etileno foram encontrados na menor concentração de sacarose (15 g L<sup>-1</sup>), com 72,48 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca. Por outro lado, os tratamentos utilizando m-Top apresentaram os menores níveis com 39,82 e 48,44 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca para as concentrações de 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente (Figura 5C).

Os teores de metil jasmonato foram maiores para o tratamento controle (ausência de citocinina), com média de 2,82 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca, diferindo dos teores produzidos nas plantas cultivadas com as fontes de citocininas BAP e m-Top que apresentaram média de 1,21 e 1,27 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca, respectivamente (Figura 5D).

Os teores de giberelina na parte aérea variaram de acordo com a citocinina utilizada, onde o tratamento com BAP apresentou maior teor, com valor médio igual a 359,54 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca. Variações semelhantes ocorreram para a

parte radicular, na qual o tratamento com BAP apresentou maior teor, com valor médio igual a 599,72 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca. Para as duas concentrações de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>), os teores mais elevados foram observados na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, tanto na parte aérea, quanto na parte radicular (Figura 5E).

Para os níveis de zeatina na parte aérea, os maiores valores foram encontrados nos tratamentos contendo m-Top, com 70,26 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca, e, os menores foram observados nos tratamentos sem adição de citocinina, com 58,92 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca. Por outro lado, na zona radicular, os maiores teores foram encontrados nos tratamentos com BAP, e quando se comparam as concentrações de sacarose 15 e 30 g L<sup>-1</sup>, observa-se o maior teor de zeatina na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com valor médio igual a 61,72 ng g<sup>-1</sup> de massa fresca (Figura 5F).

Na Tabela 1, estão apresentadas as estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson entre as características relacionadas ao crescimento e desenvolvimento dos explantes de *Zingiber spectabile* com os níveis endógenos de fitormônios.

**Tabela 1.** Estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson, entre variáveis de crescimento e fitormônios de plantas de *Zingiber spectabile* micropropagadas em biorreatores RITA®, por 45 dias, com diferentes concentrações de sacarose e fontes de citocinina em meio de cultura

	CP	NB	MF	MS	DM	NF	MT	EZ	GA_PA	ZE_PA	MEJ_PA	AS_PA	ET_PA	AIA_PA	ABA_PA	JAS_PR	GA_PR	ZE_PR	MEJ_PR	AS_PR	ET_PR	AIA_PR	
NB	0.17 <sup>ns</sup>																						
MF	0.37 <sup>ns</sup>	0.52 <sup>ns</sup>																					
MS	0.64 <sup>ns</sup>	0.75 <sup>ns</sup>	0.86*																				
DM	0.62 <sup>ns</sup>	-0.42 <sup>ns</sup>	-0.34 <sup>ns</sup>	-0.12 <sup>ns</sup>																			
NF	0.39 <sup>ns</sup>	0.96**	0.56 <sup>ns</sup>	0.83*	-0.25 <sup>ns</sup>																		
MT	-0.52 <sup>ns</sup>	-0.74 <sup>ns</sup>	-0.22 <sup>ns</sup>	-0.91*	-0.14 <sup>ns</sup>	-0.90*																	
EZ	0.28 <sup>ns</sup>	-0.26 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	-0.01 <sup>ns</sup>	0.57 <sup>ns</sup>	-0.30 <sup>ns</sup>	0.35 <sup>ns</sup>																
GA_PA	0.39 <sup>ns</sup>	-0.20 <sup>ns</sup>	-0.52 <sup>ns</sup>	-0.15 <sup>ns</sup>	0.64 <sup>ns</sup>	-0.15 <sup>ns</sup>	0.06 <sup>ns</sup>	0.42 <sup>ns</sup>															
ZE_PA	-0.85*	0.00 <sup>ns</sup>	-0.04 <sup>ns</sup>	-0.38 <sup>ns</sup>	-0.61 <sup>ns</sup>	-0.20 <sup>ns</sup>	0.27 <sup>ns</sup>	-0.11 <sup>ns</sup>	-0.67 <sup>ns</sup>														
MEJ_PA	-0.69 <sup>ns</sup>	-0.12 <sup>ns</sup>	-0.48 <sup>ns</sup>	-0.60 <sup>ns</sup>	-0.30 <sup>ns</sup>	-0.20 <sup>ns</sup>	-0.37 <sup>ns</sup>	-0.57 <sup>ns</sup>	-0.45 <sup>ns</sup>	0.64 <sup>ns</sup>													
AS_PA	-0.17 <sup>ns</sup>	-0.16 <sup>ns</sup>	-0.26 <sup>ns</sup>	-0.34 <sup>ns</sup>	0.37 <sup>ns</sup>	-0.23 <sup>ns</sup>	-0.13 <sup>ns</sup>	0.52 <sup>ns</sup>	-0.10 <sup>ns</sup>	0.48 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>												
ET_PA	0.25 <sup>ns</sup>	-0.07 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	0.15 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	-0.39 <sup>ns</sup>	-0.23 <sup>ns</sup>	-0.61 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	0.30 <sup>ns</sup>	0.25 <sup>ns</sup>											
AIA_PA	0.39 <sup>ns</sup>	-0.66 <sup>ns</sup>	-0.08 <sup>ns</sup>	-0.21 <sup>ns</sup>	0.74 <sup>ns</sup>	-0.50 <sup>ns</sup>	0.11 <sup>ns</sup>	0.42 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	-0.23 <sup>ns</sup>	-0.06 <sup>ns</sup>	0.43 <sup>ns</sup>	0.62 <sup>ns</sup>										
ABA_PA	-0.72 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>	0.14 <sup>ns</sup>	-0.17 <sup>ns</sup>	-0.69 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	-0.04 <sup>ns</sup>	-0.40 <sup>ns</sup>	-0.87*	0.92*	0.72 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.34 <sup>ns</sup>	-0.23 <sup>ns</sup>									
JAS_PR	0.28 <sup>ns</sup>	-0.08 <sup>ns</sup>	-0.34 <sup>ns</sup>	-0.16 <sup>ns</sup>	0.68 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	-0.68 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	-0.08 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.71 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>ns</sup>	0.57 <sup>ns</sup>	-0.03 <sup>ns</sup>								
GA_PR	0.83*	0.39 <sup>ns</sup>	0.21 <sup>ns</sup>	0.59 <sup>ns</sup>	0.58 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>ns</sup>	-0.53 <sup>ns</sup>	0.49 <sup>ns</sup>	0.61 <sup>ns</sup>	-0.71 <sup>ns</sup>	-0.72 <sup>ns</sup>	0.02 <sup>ns</sup>	-0.17 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	-0.71 <sup>ns</sup>	0.28 <sup>ns</sup>							
ZE_PR	0.26 <sup>ns</sup>	0.21 <sup>ns</sup>	-0.05 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.52 <sup>ns</sup>	0.23 <sup>ns</sup>	-0.53 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>	0.85*	0.26 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>	0.81*	0.49 <sup>ns</sup>						
MEJ_PR	-0.04 <sup>ns</sup>	-0.65 <sup>ns</sup>	-0.48 <sup>ns</sup>	-0.47 <sup>ns</sup>	0.27 <sup>ns</sup>	-0.67 <sup>ns</sup>	0.73 <sup>ns</sup>	0.31 <sup>ns</sup>	0.68 <sup>ns</sup>	-0.35 <sup>ns</sup>	-0.34 <sup>ns</sup>	-0.31 <sup>ns</sup>	-0.63 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	-0.61 <sup>ns</sup>	-0.39 <sup>ns</sup>	-0.02 <sup>ns</sup>	-0.49 <sup>ns</sup>					
AS_PR	-0.46 <sup>ns</sup>	-0.52 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>	-0.42 <sup>ns</sup>	-0.11 <sup>ns</sup>	-0.61 <sup>ns</sup>	0.56 <sup>ns</sup>	0.27 <sup>ns</sup>	-0.59 <sup>ns</sup>	0.69 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.54 <sup>ns</sup>	0.41 <sup>ns</sup>	0.48 <sup>ns</sup>	0.58 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>	-0.61 <sup>ns</sup>	0.10 <sup>ns</sup>	-0.08 <sup>ns</sup>				
ET_PR	0.12 <sup>ns</sup>	0.45 <sup>ns</sup>	-0.30 <sup>ns</sup>	0.06 <sup>ns</sup>	0.30 <sup>ns</sup>	0.39 <sup>ns</sup>	-0.50 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.50 <sup>ns</sup>	-0.07 <sup>ns</sup>	-0.04 <sup>ns</sup>	0.44 <sup>ns</sup>	-0.41 <sup>ns</sup>	-0.29 <sup>ns</sup>	-0.19 <sup>ns</sup>	0.45 <sup>ns</sup>	0.60 <sup>ns</sup>	0.70 <sup>ns</sup>	-0.16 <sup>ns</sup>	-0.46 <sup>ns</sup>			
AIA_PR	-0.11 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>	-0.14 <sup>ns</sup>	-0.18 <sup>ns</sup>	0.25 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	-0.52 <sup>ns</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	-0.31 <sup>ns</sup>	0.47 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>ns</sup>	0.91*	0.50 <sup>ns</sup>	0.36 <sup>ns</sup>	0.48 <sup>ns</sup>	0.82*	-0.02 <sup>ns</sup>	0.86*	-0.63 <sup>ns</sup>	0.43 <sup>ns</sup>	0.41 <sup>ns</sup>		
ABA_PR	-0.40 <sup>ns</sup>	0.52 <sup>ns</sup>	-0.07 <sup>ns</sup>	-0.01 <sup>ns</sup>	-0.26 <sup>ns</sup>	0.35 <sup>ns</sup>	-0.39 <sup>ns</sup>	0.10 <sup>ns</sup>	-0.21 <sup>ns</sup>	0.62 <sup>ns</sup>	0.38 <sup>ns</sup>	0.63 <sup>ns</sup>	-0.15 <sup>ns</sup>	-0.42 <sup>ns</sup>	0.55 <sup>ns</sup>	0.29 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	0.63 <sup>ns</sup>	-0.55 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	0.70 <sup>ns</sup>	0.66 <sup>ns</sup>	

**Legenda:** CP: Comprimento; NB: Número de brotos; MF: Massa fresca; MS: Massa seca; DM: Diâmetro; NF: Número de folhas; MT: Mortalidade; EZ: Enraizamento; GA\_PA: Giberelina Parte Aérea; ZE\_PA: Zeatina Parte Aérea; MEJ\_PA: Metil Jasmonato Parte Aérea; AS\_PA: Ácido Salicílico Parte Aérea; ET\_PA: Etileno Parte Aérea; AIA\_PA: Auxina Parte Aérea; ABA\_PA: Ácido Abscísico Parte Aérea; JAS\_PR: Jasmonato Parte Radicular; GA\_PR: Giberelina Parte Radicular; ZE\_PR: Zeatina Parte Radicular; MEJ\_PR: Metil Jasmonato Parte Radicular; AS\_PR: Ácido Salicílico Parte Radicular; ET\_PR: Etileno Parte Radicular; AIA\_PR: Auxina Parte Radicular; ABA\_PR: Ácido Abscísico Parte Radicular.

Para os parâmetros relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, houve correlações positivas significativas entre massa fresca e massa seca; número de folhas e número de brotos; número de folhas e massa seca, e negativas entre mortalidade e massa seca e mortalidade e número de folhas. Já para a relação entre os fitormônios, houve correlações positivas significativas entre ABA e zeatina, na parte aérea; zeatina e ácido salicílico, na parte aérea; auxina e ácido salicílico na parte aérea; zeatina e jasmonato na zona radicular, auxina e jasmonato na zona radicular; auxina e zeatina na zona radicular, e correlação negativa entre ABA e giberelina na parte aérea. Para interação entre variáveis de crescimento e fitormônios, somente o comprimento das plantas e giberelina na parte radicular correlacionaram-se positivamente.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Parâmetros de crescimento

As citocininas compreendem uma família de moléculas de sinalização que agem em diferentes processos morfogênicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento de plantas (Osugi & Sakakibara, 2015). No cultivo *in vitro*, fontes exógenas de citocininas, em concentrações adequadas e balanceadas, promovem mudanças no perfil hormonal de explantes induzindo o aumento de brotações (Monfort et al., 2012).

No presente estudo, as fontes de citocininas BAP e m-Top influenciaram positivamente o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas de *Zingiber spectabile*, com exceção de m-Top na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Gutiérrez et al. (2016) utilizando meio líquido acrescido de BAP e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, em biorreatores de imersão temporária RITA<sup>®</sup>, observaram aumento significativo de novos brotos para *Guadua angustifolia*, corroborando com o presente estudo.

Para outras espécies como *Spathiphyllum floribundum* (Werbrouck et al., 1996), *Aloe polyphylla* (Bairu et al., 2007), *Cotinus coggygia* Scop (Podwyszyńska et al., 2012), *Zingiber officinale* (El-Nabarawy et al., 2015) e *Pyrus communis* (Dimitrova et al., 2016), cultivadas em sistema convencional em meio semissólido, a adição de BAP e m-Top apresentaram padrão de resposta semelhante aos resultados do presente estudo, com aumento no número de brotos, evidenciando a eficiência na taxa de micropropagação. De modo geral, as citocininas atuam na regulação da divisão e expansão celular (Aremu et al., 2012).

De acordo com Nery et al. (2015), o incremento de BAP em meio de cultura auxilia na indução de brotações de *Zingiber spectabile*. Da mesma forma, El-Nabarawy et al. (2015) demonstraram que a utilização de BAP foi mais eficiente para manutenção de calos de *Zingiber officinale* quando comparado com cinetina. Além disso, estudos demonstraram que a citocinina m-Top apresenta elevado potencial morfogênico, obtendo sucesso na multiplicação de *Pyrus communis* (Dimitrova et al., 2016).

Contudo, para *Zingiber officinale* a adição de BAP no meio de cultivo não promoveu aumento significativo no número de brotações (Silva Júnior et al., 2015). Em outros casos, a utilização de BAP diminuiu a taxa de regeneração e o número de brotos de *Solanum melongena* (Muktadir et al., 2016). Assim como elevadas concentrações de BAP podem afetar o desenvolvimento de explantes, conforme observado em plantas híbridas de *Citrus paradisi* com *Poncirus trifoliata* que apresentaram reduzido número de ramificações laterais (Cantagallo et al., 2005). Possivelmente, elevadas concentrações de BAP em meio de cultivo pode induzir uma reação negativa nas vias de sinalização de indução de desenvolvimento, bem como, promover efeitos fitotóxicos pela adição de elevadas concentrações de BAP (Rolli et al., 2011; Shigenaga & Argueso, 2016).

#### **4.2 Características anatômicas**

Para *Zingiber spectabile*, foram observadas diferenças na anatomia foliar no cultivo em biorreatores RITA<sup>®</sup> utilizando diferentes concentrações de sacarose e fontes de citocinina. Entretanto, no tratamento controle (ausência de citocinina) e com adição de m-Top notou-se pouca deposição de cutícula nas células epidérmicas, elevado número de espaços intracelulares na região do mesofilo, maior desorganização do parênquima e nervura mediana menos desenvolvida. Essas características corroboram com as observadas de Ribeiro et al. (2009) e Saldanha et al. (2013), onde vitroplantas apresentaram células epidérmicas maiores e irregulares, espaços intercelulares no mesofilo, pouca diferenciação entre o mesofilo e os tecidos vasculares, pequena deposição de cutícula e parede celular, resultando em uma estrutura frágil com maior facilidade de sofrer danos mecânicos.

Do mesmo modo, foi observado o acúmulo de carboidratos nas células mesofílicas, maior desenvolvimento do sistema vascular, caracterizado pela formação de metaxilema nos tratamentos com adição de BAP sob duas concentrações de sacarose (15 e 30 g L<sup>-1</sup>). Foram evidenciados em todos os tratamentos corpos lipídicos no interior de idioblastos e na cutícula da parede celular das células epidérmicas e corpos proteicos em células mesofílicas.

Rocha et al. (2012) descreveram que os principais compostos de reservas utilizado pelas plantas para desenvolvimento *in vitro* são os carboidratos, lipídios

e proteínas, sendo que os teores desses compostos são específicos para cada espécie. De modo geral, as proteínas estão envolvidas em regulamento e expansão celular. Os lipídeos em conjunto com as proteínas desempenham papel fundamental na composição das membranas celulares. E os carboidratos são fonte primária de energia para o crescimento e proliferação celular (Silva et al., 2015).

No presente estudo, observou-se em todos os tratamentos a presença de mistura de óleo essencial, juntamente com óleo resina em células epidérmicas e mesofílicas de folhas de *Zingiber spectabile*. Victorio et al. (2011) ressaltaram que a presença de idioblastos contendo compostos lipídicos em seu interior é comum nas folhas de espécies de Zingiberaceae. Esses mesmos autores detectaram óleos essenciais em células mesofílicas em espécies pertencentes à família das Zingiberaceae. Dessa forma, acredita-se que esse composto possa estar relacionado com atividade antioxidante e anti-inflamatória da espécie.

### **4.3 Perfil hormonal**

Os fitormônios são substâncias químicas que atuam em muitos processos químicos e fisiológicos durante o desenvolvimento das plantas (Miransari & Smith, 2014). Contudo, há poucos estudos que subsidiem informações fitormonais de vitroplantas cultivadas com suplementação de citocininas, sendo este o primeiro registro do perfil hormonal de *Z. spectabile* nessas condições.

Como os fitormônios desempenham papel vital nas respostas morfogênicas, tem sido realizada a identificação dos genes que regulam a acumulação dos hormônios que afetam a senescência foliar (Penfold & Buchanan-Wollaston, 2014). Contudo, as variações naturais desses fitormônios em diferentes espécies ainda não são bem compreendidas (Fang et al., 2016). Nesse sentido, vários fitormônios vêm sendo identificados na regulação da senescência foliar (Fukao et al., 2012; Zhang et al., 2012), sendo jasmonato e seus derivados os primeiros compostos de indução de senescência a serem identificados (Ueda & Kato, 1980). Nas plantas, a senescência está associada à idade das folhas, envolvendo morte celular programada, o que permite a reciclagem e reutilização de recursos intrínsecos do vegetal (Hortensteiner & Feller, 2002; Lim et al., 2003).

Nesse sentido, outros trabalhos revelaram que senescência foliar é estimulada por uma via de sinalização induzida por jasmonato (Qi et al., 2015). Nesse sentido, Fang et al. (2016) demonstraram que teores de jasmonato são consideravelmente discrepantes em duas cultivares de *Oryza sativa*, afetando diretamente a velocidade de senescência das plantas. Do mesmo modo, sabe-se que esse fitorregulador está associado à defesa das plantas contra diversos tipos de estresse.

Contudo, Campos et al. (2016) relataram que o aumento dos níveis de jasmonato, diminui o crescimento e desenvolvimento de plantas uma vez que, todos os processos metabólicos e fisiológicos são voltados para defesa do vegetal. Essas informações corroboram com os resultados desse trabalho, onde tratamentos sem adição de citocinina obtiveram maiores teores de jasmonato, como também menores taxas de crescimento e desenvolvimento.

Da mesma forma, Li et al. (2015) descreveram que a regulação positiva de jasmonato induz uma regulação negativa de giberelina, impedindo crescimento normal das plantas. Essas informações confirmam os resultados obtidos nessa pesquisa, onde tratamentos sem adição de citocinina exógena apresentaram elevados teores de jasmonato e não obtiveram biossíntese de giberelinas, ao passo que, em tratamentos com adição de citocinina exógena, obteve-se menores níveis de jasmonato e maiores níveis de giberelina, possibilitando o crescimento e desenvolvimento normal dos explantes de *Z. spectabile*.

Elhiti & Stasolla, (2012) observaram a expressão diferencial de ABA em mutantes de *Arabidopsis*, onde o maior acúmulo de citocininas biologicamente ativas induziu a redução dos níveis de ABA. Essa relação pode ser explicada devido ao fato das citocininas serem responsáveis pela rápida reativação do meristema apical ao passo que o ABA induz o aumento do tempo de replicação do DNA, atrasando a multiplicação celular. Assim, maiores níveis de citocinina reduzem níveis ABA, induzindo maiores taxas de multiplicação e desenvolvimento dos explantes. Esses dados corroboram com os resultados do referido trabalho, uma vez que, nos tratamentos com adição de BAP, os níveis de ABA foram consideravelmente baixos.

Do mesmo modo, Holub et al. (1998) relataram que existem dois grupos distintos de citocinina. Enquanto as isoprenoides tem efeito mais potente sobre o

crescimento e processos que envolvam a continuação do ciclo celular, as aromáticas exercem maior influência sobre os processos de desenvolvimento, como morfogênese e redução de senescência. Nesse sentido, Aremu et al. (2014) relataram que em plantas de *Musa* micropropagadas com ausência de citocinina exógena, as citocininas endógenas encontradas de forma predominante foram as isoprenoides. Por outro lado, quando utilizado metatopolina exógenas, o conteúdo endógeno que prevaleceu foi de citocininas aromáticas. Dessa forma, fica claro que a resposta de desenvolvimento de explantes para fontes exógenas de reguladores de crescimento está relacionada com sua concentração no meio de cultivo que, por sua vez, está relacionada com a absorção, metabolismo e transporte dos fitormônios no interior do explante (Krikorian, 1995).

Para o etileno Zdarska et al. (2015) relataram que este é sintetizado em todos os tecidos da planta. Entretanto, Cary et al. (1995) demonstraram que adição de citocininas pode induzir a produção de etileno, levando a alterações morfológicas típicas desse regulador. Nesse sentido, Hansen et al. (2009); Zdarska et al. (2013) afirmaram que enzimas da via biossintética do etileno são rapidamente reguladas por citocininas e que esse efeito é específico nos tecidos radiculares, não afetando níveis de ACC na parte aérea, corroborando com os dados desse trabalho, onde os tratamentos com adição de BAP acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, observou-se maior biossíntese de etileno na área radicular.

#### **4.4 Correlação de Pearson**

Os fitormônios coordenam processos fisiológicos programados, como também respostas que são induzidas por estímulos externos. Mesmo tendo diferentes homônios que regulam processos biológicos distintos, muitas vezes há a necessidade de interações complexas entre múltiplas vias hormonais (Zhang et al., 2016).

Nesse sentido, Shigenaga & Argueso (2016) relataram que elevados níveis de citocinina são mediados por ácido salicílico, da mesma forma que a ativação de genes que expressam a síntese de ácido salicílico são dependentes de citocinina. Essas informações corroboram com os dados desse trabalho, onde foi observado correlação positiva entre esses dois fitorreguladores.

Sun et al. (2009) demonstraram que já foram detectados muitos cruzamentos nas vias de sinalização de jasmonato e auxina, tanto na expressão de genes como no metabolismo, uma vez que elevados níveis de jasmonatos podem induzir a biossíntese de auxina, como também a regulação de dois genes de biossíntese de auxina (*YUCCA8* e *YUCCA9*) estão relacionadas com a indução influenciada por jasmonato (Hentrich et al., 2013). Do mesmo modo, níveis consideráveis de auxina podem induzir a expressão de genes da biossíntese do jasmonato, promovendo fertilidade de botões florais (Zhang et al., 2016).

Em relação à interação entre auxina e ácido salicílico, há evidências que esses dois reguladores atuem na adaptação de plantas ao estresse salino (Fahad et al., 2015a), de forma que a salinidade reduz níveis de auxina, entretanto, o acúmulo de ácido salicílico induz maior biossíntese de auxina (Fahad & Bano, 2012).

As citocininas induzem a germinação de sementes (Fahad et al., 2015b). Entretanto, em plantas com escassez de água ocorre diminuição dos teores de citocinina e aumento nos teores de ABA, esses reguladores têm como características principais a indução de dominância apical e a abertura estomática, respectivamente, que, por sua vez, auxiliam na adaptação ao estresse (O'Brien & Benkova, 2013).

Da mesma forma, Avalbaev et al. (2016) relataram que o aumento dos níveis de jasmonato resulta em um acúmulo dos níveis de citocininas, sugerindo que as citocininas possuem papel importante na implementação dos efeitos fisiológicos de jasmonato, uma vez que estão envolvidas em uma vasta gama de processos metabólicos, desempenhando papel fundamental na regulação hormonal do crescimento e desenvolvimento de plantas. Essas informações atestam a correlação positiva encontrada entre jasmonato e citocinina.

A interação entre auxina e citocinina é fundamental para o desenvolvimento vegetal, uma vez que estes reguladores estão relacionados com o desenvolvimento de raízes laterais, padrão de divisão celular, dominância apical entre outros (Muraro et al., 2013). Chandler & Werr. (2015) demonstraram que auxina e citocinina têm papéis antagonistas em células iniciais via “regulação cruzada” indireta do controle do ciclo celular e expressão de proteínas PIN, as

quais são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas. Esses dados corroboram com as informações obtidas pela análise do diagrama de correlação de Pearson, onde é possível observar uma correlação positiva entre auxina e citocinina, confirmando a necessidade de uma “regulação cruzada” entre esses dois fitormônios para o desenvolvimento normal das plantas.

Nesse sentido, é possível concluir que fontes exógenas de citocinina combinadas com diferentes concentrações de sacarose promovem crescimento e desenvolvimento distintos em explantes de *Z. spectabile*. Da mesma forma, é possível observar diferenças nas características anatômicas dos diferentes tratamentos, sendo essas diferenças causadas pela variação nas concentrações de sacarose utilizadas. Através dos testes histoquímicos, foi possível caracterizar estruturas proteicas e lipídicas, comumente encontradas em diferentes espécies da família das Zingiberaceae. Pela análise de perfil hormonal foi possível observar a biossíntese dos fitorreguladores e a interação entre eles, contudo, novas pesquisas devem ser realizadas para que seja possível afirmar essas interações e compreender melhor os mecanismos de regulação hormonal nessa espécie.

## 5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, E. S. B.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botânica Brasilica**, 18: 109-121, 2004.

ARAGÓN, C. E.; SÁNCHEZ, C.; GONZALEZ-OLMEDO, J.; ESCALONA, M.; CARVALHO L.; AMÂNCIO, S. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. **Biologia Plantarum**, 58: 29–38, 2014.

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 108:1–16, 2012.

AREMU, A. O.; PLAČKOVA, L.; BAIRU, M. W.; NOVAK, O.; SZUČOVA, L.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. Endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured and acclimatized ‘Williams’ bananas subjected to different aromatic cytokinin treatments. **Plant Science**, 214: 88– 98, 2014.

AVALBAEV, A.; YULDASHEV, R.; FEDOROVA, K.; SOMOV, K.; VYSOTSKKAYA, L.; ALLAGULOVA, C.; SHAKIROVA, F. Exogenous methyl jasmonate regulates cytokinin content by modulating cytokinin oxidase activity in wheat seedlings under salinity. **Journal of Plant Physiology**, 191: 101–110, 2016.

BAIRU, M. W.; STIRK, W. A.; DOLEZAL, K.; STANDEN, J. V. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 90:15–23, 2007.

CAMPOS, M. L.; YOSHIDA, Y.; MAJOR, I. T.; FERREIRA, D. O.; WERADUWAGE, S. M. FROELICH, J. E.; JOHNSON, B. F.; KRAMER, D. M.; JANDER, G.; SHARKEY, T. D.; HOWE, G. A. Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth- defense tradeoffs. **Nature Communications**, 30;7:12570, 2016.

CANTAGALLO, F. S.; AZEVEDO, F. A.; SCHINOR, E. H.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Micropropagação de citrumelo „swingle” pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27: 136–138, 2005.

CARY, A. J.; LIU, W.; HOWELL, S.H. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**, 107:1075–1082, 1995.

CHANDLER, J. W.; WERR, W. Cytokinin–auxin crosstalk in cell type specification. **Trends in Plant Science**, 20: 291–300, 2015.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 35: 271–276, 2013.

DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris, Série D**, 258: 1338–1340, 1964.

DIMITROVA, N.; NACHEVA, L.; BERVORA, M. effect of *meta*-topolin on the shoot multiplication of pear rootstock ohf-333 (*Pyrus communis* L.). **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, 15: 43–53, 2016.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. Abnormal development and altered hormone profile and sensitivity in Arabidopsis plants ectopically expressing Brassica shoot apical meristem genes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 10: 23–32, 2012.

EL-NABARAWY, M. A.; EL-KAFITI, S. H.; HAMZA, M. A.; OMAR, M. A. The effect of some factors on stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. **Annals of Agricultural Science**, 60: 1–9, 2015.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69: 215–231, 2002.

FAHAD, S.; BANO, A. Effect of salicylic acid on physiological and biochemical characterization of maize grown in saline area. **Pakistan Journal of Botany**, 44: 1433–1438, 2012.

FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; BANO, A.; SAUD, S.; HASSAN, S.; SHAN, D.; KHAN, F. A.; KHAN, F.; CHEN, Y. T.; WU, C.; TABASSUM, M. A.; CHUN, M. X.; AFZAL, M.; JAN, A.; JAN, M. T.; HUANG, J. L. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. **Environmental Science and Pollution Research**, 22: 4907–4921, 2015a.

FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; MATLOOB, A.; KAN, F. A.; KHALIQ, A.; SAUD, S.; HASSAN, S.; SHAN, D.; KHAN, F.; ULLAH, N.; FAIQ, M.; KHAN, M. R.; TAREEN, A. K.; KHAN, A.; ULLAH, A.; ULLAH, N.; HUANG, J. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. **Plant Growth Regulation**, 75: 391–404, 2015b.

FANG, C. Y.; ZHANG, H.; WAN, J.; WU, Y. Y.; LI, K.; JIN, C.; CHEN, W.; WANG, S. C.; WANG, W. S.; ZHANG, H. W.; ZHANG, P.; ZHANG, F.; QU, L. H.; LIU, X.; ZHOU, D. X.; LOU, J. Control of leaf senescence by a MeOH-jasmonates cascade that is epigenetically regulated by OsSRT1 in rice. **Molecular Plant**, 2016.

FEDER, N., O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, 55: 123–142, 1968.

FLORES, R.; BRONDANI JÚNIOR, D.; CEZAROTTO JUNIOR, V.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. T. Micropropagation and  $\beta$ -ecdysone content of the Brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 46: 210–217, 2010.

FOSTER, A. S. Practical plant anatomy. New York: D. Van Nostrand Co. 1950.

FRANÇA, C. A. M.; SOUZA, M. P.; PEDROSO, E. A.; SILVA, T. N.; SOUZA FILHO, T. A. Flores e Folhagens Tropicais: Mercado em Expansão. **V Encontro Nacional da Anppas**, 2010.

FUKAO, T.; YEUNG, E.; BAILEY-SERRES, J. The submergence tolerance gene SUB1A delays leaf senescence under prolonged darkness through hormonal regulation in rice. **Plant Physiology**, 160: 1795–1807, 2012.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, 89: 244–249, 2016.

GUTIÉRREZ, L. G.; LÓPEZ-FRANCO, R.; MORALES-PINZÓN. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA®. **African Journal of Biotechnology**, 15: 1503- 1510, 2016.

HANSEN, M.; CHAE, H. S.; KIEBER, J. J. Regulation of ACS protein stability by cytokinin and brassinosteroid. **The Plant Journal**, 57: 606– 614, 2009.

HENTRICH, M.; BOTTCHER, C.; DUCHTING, P.; CHENG, Y.; ZHAO, Y.; BERKOWITZ, O.; MASLE, J.; MEDINA, J.; POLLMANN, S. The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. **The Plant Journal**, 74: 626–637, 2013.

HOBUB, J.; HANŮS, J.; HANKE, D. E.; STRNAD, M. Biological activity of cytokinins derived from ortho- and meta-hydroxybenzyladenine. **Plant Growth Regulation**, 26: 109–115, 1998.

HORTENSTEINER, S.; FELLER, U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. **Journal of Experimental Botany**, 53 53:927-937, 2002.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27:127–128, 1965.

KIRK, JR. P. Neutral red as lipid fluorochrome. *Stain Technology*, 1970.

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation, in: P.J. Davies (Ed.), **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 774–796, 1995.

LI, R.; ZHANG, J.; LI, J.; ZHOU, G.; WANG, Q.; BIAN, W.; ERB, M.; LOU, Y. Prioritizing plant defence over growth through WRKY regulation facilitates infestation by non-target herbivores. **Elife**, 4:e04805, 2015.

LIM, P.O.; WOO, H.R.; NAM, H.G. Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, 603: 272–278, 2003.

MAKTADIR, M. A.; HABIB, M. A.; MIAN, M. A. K.; AKHOND, M. A. Y. Regeneration efficiency based on genotype, culture condition and growth regulators of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Agriculture and Natural Resources**, 50: 38–42, 2016.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, 99: 110–121, 2014.

MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; SANTOS, F. M. Effect of BAP on in vitro culture of *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14: 458–463, 2012.

MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Plant Methods**, 7: 37, 2011.

MURARO, D.; BYRNE, H.; KING, J.; BENNETT, M. The role of auxin and cytokinin signalling in specifying the root architecture of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Theoretical Biology**, 317: 71–86, 2013.

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

NERY, F. C.; GOULART, V. L. A.; PAIVA, P. D. O.; REIS, M. V.; SILVA, L. C.; PRUDENTE, D. O.; NERY, M.C.; ALMEIDA, E. F. A. Micropropagation and Chemical Composition of *Zingiber spectabile* Callus. **Acta Horticulturae**, 1083: 197–204, 2015.

O'BRIEN, J. A.; BENKOVÁ, E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, 19: 4: 451, 2013.

O'BRIEN, T. P., McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981.

OSUGI, A.; SAKAKIBARA, H. Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? **BMC Biology**, 13:102, 2015.

PEARSE, A. Histochemistry: theoretical and applied. Vol. 2' 3<sup>a</sup>.ed. 1972.

PENFOLD, C. A.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Modelling transcriptional networks in leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, 628: 3859–3873, 2014.

PODWYSZYŃSKA, M.; WĘGRZYNOWICZ-LESIAK, E.; DOLEZAL, K.; KREKULE, K.; STRNAD, M.; SANIEWSKI, M. New cytokinin– meta-methoxytopolins in micropropagation of *Cotinus coggygria* Scop. ‘Royal Purple’. **Propagation of ornamental plants**, 12: 220–228, 2012.

QI, T.; WANG, J.; HUANG, H.; LIU, B.; GAO, H.; LIU, Y.; SONG, S.; XIE, D. Regulation of Jasmonate-Induced Leaf Senescence by Antagonism between bHLH Subgroup IIIe and IIIc Factors in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, 2015.

QUIALA, E.; CAÑAL, M. J.; MEIJÓN, M.; RODRIGUEZ, R.; CHÁVEZ, M.; VALLEDOR, L.; FERIA, M.; BARBÓN, R. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109: 223–34, 2012.

RAMOS-CASTELLÁ, A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BELLO-BELLO, J.; LEE-ESPINOSA, H. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 50: 576–81, 2014.

RIBEIRO, A. P. O.; PICOLI, E. A. T.; LANI, E. R. G.; VENDRAME, W. A.; OTONI, W. C. The influence of flask sealing on in vitro morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology– Plant**, 45: 421–428, 2009.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, 249: 747–758, 2012.

ROLLI, E.; RICCI, A.; BIANCHI, A.; BRUNI, R. Optimisation of *in vitro* propagation of *Hyssopus officinalis* L. using two-node explants and N-phenyl-N'-benzothiazol-6-yl-urea (PBU), a new urea-type cytokinin. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 86: 141–145, 2011.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; CRUZ, A. C. F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 49: 433–444, 2013.

SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.D.; IAREMA, L.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, 55: 356–364, 2008.

SHIGENAGA, A. M.; ARGUESO, C. T. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 56: 174–189, 2016.

SILVA JÚNIOR, J. M.; PAIVA, R.; RODRIGUES, M.; MAGALHÃES, A. F. Efficiency of urea usage and growth regulators on *in vitro* propagation of *Etilingera elatior*. **INCELÊNCIAS**, 4.1, 2015.

SILVA, G. M.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C.; PEREIRA, T. N. S.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 51: 539–545, 2015.

SIVASOTHY, Y.; HADI, H. A.; MOHAMAD, K.; LEONG, K. H.; IBRAHIN, H.; SULAIMAN, S. F.; OOI, K. L.; AWANG, K. Spectraflavoside A, a new potent iron chelating dimeric flavonol glycoside from the rhizomes of *Zingiber spectabile* Griff. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22: 31–26, 2012.

SUN, J.; XU, Y.; YE, S.; JIANG, H.; CHEN, Q.; LUI, F.; ZHOU, W.; CHEN, R.; LI, X.; TIETZ, O.; WU, X.; COHEN, J. D.; PALME, K.; LI, C. Arabidopsis ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. **The Plant Cell**, 21: 1495–1511, 2009.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais Produção de mudas em larga escala. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 24:36–41, 2002.

UEDA, J.; KATO, J. Isolation and Identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). **Plant Physiology**, 66:246–249, 1980.

VICTORIO, C.P.; ARRUDA, R.C.O.; RIEHL, C.A.S.; LAGE, C.L.S. Leaf volatiles and secretory cells of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith (Zingiberaceae). **Natural Product Research**, 25: 939–948, 2011.

VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell and Molecular Biology**, 22: 45–64, 1977.

VIDAL, N.; BLANCO, B.; CUENCA, B. A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 123: 229–243, 2015.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution **Journal of Plant Physiology**, v.144, p.307–313, 1994.

WERBROUCK, S.; STRNAD, M.; VAN ONCKELEN, H.; DEBERGH, P. Metatopolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? **Physiologia Plantarum**, 98: 291–297, 1996.

ZDARSKA, M.; ZATLOUKALOVÁ, P.; BENÍTEZ, M.; ŠEDO, O.; POTĚŠIL, D.; NOVÁK, O.; SVAČINOVÁ, J.; PEŠEK, B.; MALBECK, J.; VAŠÍČKOVÁ, J.; ZDRÁHAL, Z.; HEJÁTKO, J. Proteome analysis in *Arabidopsis* reveals shoot- and root-specific targets of cytokinin action and differential regulation of hormonal homeostasis. **Plant Physiology**, 161: 818–930, 2013.

ZDARSKA, M.; DOBISOVÁ, T.; GELOVÁ, S.; PERNISOVÁ, M.; DABRAVOLLSKI, S.; HEJÁTKO, J. Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development- Review Paper. **Journal of Experimental Botany**, 66: 4913–4931, 2015.

ZHANG, T.; POUDEL, A. N.; JEWELL, J. B.; KITAOKA, N.; STASWICK, P.; MATSUURA, H.; KOO, A. J. Hormone crosstalk in wound stress response: woundinducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, 67: 2107–2120, 2016.

ZHANG, W.; ZHOU, X.; WEN, C.K. Modulation of ethylene responses by OsRTH1 overexpression reveals the biological significance of ethylene in rice seedling growth and development. **Journal of Experimental Botany**, 63: 4151–4164, 2012.

## CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho foi necessário realizar modificações no protocolo de criopreservação, ajustando as melhores concentrações e soluções criogênicas de acordo com o melhor desenvolvimento dos explantes de *Pfaffia glomerata*. Da mesma forma, foi possível constatar que a rustificação de vitroplantas de *P. glomerata*, pelo processo fotoautotrófico não contribui para aumentar as taxas de regeneração de explantes criopreservados.

Do mesmo modo, constatou-se que, utilizando solução de pré-cultivo acrescido de 0,75 M de sacarose por 24 horas à temperatura de 4 °C, com posterior imersão em solução de saturação composta por glicerol (2 M) e sacarose (0,4 M) por 20 minutos e em seguida de solução crioprotetora PVS2, composta por glicerol (30%), etileno glicol (15%), DMSO (15%), sacarose (13,6%), por uma hora, seguido por imersão em nitrogênio líquido, foi possível recuperar um explante criopreservado.

Nesse contexto, observou-se que genótipos de *P. glomerata* possuem uma tendência à tolerância a baixas temperaturas, possibilitando, dessa forma, os processos de criopreservação. Contudo, acredita-se que seja necessário a otimização no processo de recuperação dos explantes criopreservados, com modificações no meio de cultivo, adição de compostos antioxidantes como também controle do fotoperíodo e irradiância, aumentando, dessa forma, as taxas de sobrevivência de explantes criopreservados.

Por outro lado, no estudo realizado com multiplicação *in vitro* com brotos de *Zingiber spectabile* em biorreatores de imersão temporária, constatou-se que fontes exógenas de citocinina combinadas com diferentes concentrações de sacarose promovem crescimento e desenvolvimento distintos. Sendo possível observar que as variáveis número de brotos, massa seca e número de folhas apresentaram as maiores médias nos tratamentos com BAP nas concentrações de 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e no tratamento com m-Top na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Da mesma forma, verificou-se diferenças nas características anatômicas entre os tratamentos. Acredita-se que essas diferenças sejam causadas pelas diferentes concentrações de sacarose utilizada, onde a concentração de 15 g L<sup>-1</sup>

sacarose, demonstrou melhor organização do feixe vascular e maior vascularização quando comparados com os tratamentos de 30 g L<sup>-1</sup>.

Através dos testes histoquímicos, foi possível caracterizar estruturas proteicas e lipídicas, comumente encontradas em diferentes espécies da família das Zingiberaceae. Pela análise de perfil hormonal foi possível observar a biossíntese dos fitorreguladores e a interação entre eles.

Nesse contexto, pela utilização do diagrama linear de Pearson, foi possível observar correlação positiva entre os parâmetros de crescimento, entre os fitorreguladores e a interação dos parâmetros de crescimento e fitorreguladores, com correlação positiva entre comprimento de plantas e giberelina. Contudo, novas pesquisas devem ser realizadas para que seja possível afirmar essas interações e compreender melhor os mecanismos de regulação hormonal nessa espécie.