

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

ESTUDOS SOBRE INDUÇÃO, MANUTENÇÃO E
ESTABILIDADE GENÉTICA NA CALOGÊNESE
“*in vitro*” DE *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL).

ERICH GUIMARÃES NENARTAVIS

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

ESTUDOS SOBRE A INDUÇÃO, MANUTENÇÃO
E ESTABILIDADE GENÉTICA NA CALOGÊNESE
“*in vitro*” DE *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL).

ERICH GUIMARÃES NENARTAVIS

Sob a Orientação do Professor
Ricardo Motta Miranda

Co-orientação dos Professores
Higino Marcos Lopes
Fabiano Salgueiro

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Fitotecnica, Área de Concentração
em Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ
Julho de 2010.

571.538

N448e

T

Nenartavis, Erich Guimarães, 1971-
Estudos sobre a indução, manutenção e
estabilidade genética na calogênese "in vitro" de
caesalpinia echinata lam (pau-brasil) / Erich
Guimarães Nenartavis - 2010.
82 f.: il.

Orientador: Ricardo Motta Miranda.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Fitotecnia.

Bibliografia: f. 71-73.

1. Tecidos vegetais - Cultura e meios de
cultura - Teses. 2. Caesalpinia echinata -
Genética - Teses. I. Miranda, Ricardo Motta. II.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III.
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

ERICH GUIMARÃES NENARTAVIS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências área de Concentração em Fisiologia da Produção.

TESE APROVADA EM 30/07/2010.

Ricardo Motta Miranda. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Márcia Soares Vidal. Doutora. Embrapa Agrobiologia

Leonardo Alves Carneiro. Doutor. UERJ

Jean Luiz Simões de Araújo. Doutor. Embrapa Agrobiologia

Fabiano Guimarães Silva. Doutor. Instituto Federal Goiano

RESUMO

NENARTAVIS, Erich Guimarães. Estudos sobre indução, manutenção e estabilidade genética da calogênese *in vitro* de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-brasil). 73p. Inst. de Agronomia, Dep. de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A *Caesalpinia echinata* Lam (pau-brasil) foi protagonista do primeiro dos ciclos econômicos da história do Brasil, que contribuíram para a redução do bioma Mata Atlântica. A sua condição de espécie ameaçada de extinção (IUCN, 2008; BRASIL, 2008) se deve não só ao intenso extrativismo e à redução física de sua área de ocorrência, mas também às lacunas ainda existentes quanto ao conhecimento acerca de sua propagação (Barbedo *et al.*, 2002). A cultura de tecidos vegetais é uma técnica importante e tem sido utilizada com sucesso na propagação de várias espécies, inclusive lenhosas. Brunetta, em 2006, constata a mesma situação encontrada por Lee e Rao em 1988, de que apesar do êxito da propagação *in vitro* com plantas arbóreas de clima temperado, são poucos os trabalhos empregando essa técnica em espécies arbóreas tropicais. A calogênese é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática, sendo também útil na produção de células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações genéticas. Além destes aspectos, o cultivo de calos pode ser utilizado para obter suspensão celular, para estudar o desenvolvimento da célula e a síntese de produtos provenientes do metabolismo primário e secundário. Os efeitos da combinação de diferentes concentrações e fontes de auxina (2,4-D ou ANA) e citocinina (BAP ou KIN), em meio de cultura MS modificado, foram avaliados na indução de calogênese em diversos tipos de explante, coletados em diferentes estádios ontogenéticos de *Caesalpinia echinata* Lam. Os resultados demonstram que o uso de explantes em estádios iniciais de desenvolvimento reduziu significativamente o índice de contaminação e incrementou as taxas de calogênese. Foi constatada calogênese a partir do tegumento de sementes colhidas previamente à deiscência do fruto, que provavelmente se originou de células residuais do endosperma, ou do complexo estomático existente neste tecido. Foi possível induzir e manter calos viáveis, por longo período, a partir de explantes contendo: o genótipo da matriz; o genoma resultante da fecundação da oosfera e; possivelmente, o balanço genômico 2m:1p, resultado da dupla fecundação que origina o endosperma. Os calos foram avaliados através da técnica AFLP (polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados), quanto à possível ocorrência de variação somaclonal em função: da origem dos explantes, quantidade de subculturas e tempo de manutenção *in vitro*. A eletroforese em gel de poliacrilamida dos fragmentos corados com nitrato de prata gerou poucas bandas de boa resolução e todas monomórficas, demonstrando que é viável o uso da técnica AFLP na cultura celular da espécie, entretanto devem ser testadas novas combinações de nucleotídeos na amplificação para ampliar o poder da técnica para a detecção de variação somaclonal.

Palavras-chave: cultura de tecidos vegetais. variação somaclonal. espécie ameaçada

ABSTRACT

NENARTAVIS, Erich Guimarães. Studies on induction and maintenance of genetic stability in vitro organogenesis of *Caesalpinia echinata* Lam (Pau-Brazil). 2010. 73p. Inst. of Agronomy, Dept. of Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The *Caesalpinia echinata* Lam (Brazil wood) was the first protagonist of exploitation cycles in the history of Brazil, which contributed to the reduction of the Atlantic forest. His state of endangered species (IUCN, 2008; BRASIL, 2008) is due not only to the intense physical extraction and reduction of its range, but the persistent gaps in terms of knowledge about their spread (Barbedo et al., 2002). The plant tissue culture is an important technique and has been used successfully in the propagation of several species, including woody. Brunetta, in 2006, notes the same situation as found by Lee and Rao in 1988 that despite the success of in vitro propagation of woody plants in temperate climates, few studies employing this technique in tropical tree species. Callus formation is a basic step for the development of systems for mass propagation of plants through organogenesis or somatic embryogenesis, and is also useful in the production of cells for genetic manipulations, such as somatic hybridization, genetic transformation and poliploidizations. Besides these aspects, the callus culture may be used to obtain cell suspension, to study cell development and synthesis of products from primary and secondary metabolism. The combination effects of different concentrations and sources of auxin (2,4-D or NAA) and cytokinin (BAP or KIN) in modified MS medium, were evaluated in the induction of callus formation in different types of explants collected from different ontogenetic stages of *Caesalpinia echinata* Lam. The results demonstrate that the use of explants in the early stages significantly reduced infection rates and increased rates of callus formation. Callus formation was observed from the seed coat collected prior to dehiscence of the fruit, which probably originated from residual cells of the endosperm, or stomatal existing in this tissue. It was possible to induce callus and maintain viable for a long period, from explants contained the genotype of the stock plant, the genome resulting from fertilization of the egg cell and, possibly, the balance genomic 2m: 1p, a result of double fertilization which gives rise to the endosperm. The calluses were evaluated by AFLP (length polymorphism of amplified fragments), as to the possible occurrence of somaclonal variation in function: the source of explants, number of subcultures and maintenance time in vitro. The polyacrylamide gel electrophoresis of the fragments stained with silver nitrate produced few bands of good resolution and all monomorphic, showing that it is feasible using the AFLP technique in cell culture of the species, but should be tested in new combinations of nucleotides to amplify the power of the technique for the detection of somaclonal variation.

Keywords: plant tissue culture. Somaclonal variation. threateaned species

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de fármacos obtidos a partir de matérias-primas vegetais (Schenkel <i>et al.</i> , 2004).....	16
Tabela 2 - Exemplos de matérias-primas vegetais utilizadas na semi-síntese de fármacos (Schenkel <i>et al.</i> , 2004).....	16
Tabela 3 - Exemplos de adjuvantes farmacêuticos de origem vegetal (Schenkel <i>et al.</i> , 2004)..	17
Tabela 4- Comparativo entre os teores de metabólitos secundários produzidos em cultura de tecidos vegetais (CTV) e em plantas inteiras (Misawa, 1994).....	18
Tabela 5 - Efeito do meio de cultura na produção de células e de alcalóide (serpentina) na cultura <i>in vitro</i> de <i>Catharanthus roseus</i> (Misawa, 1994).....	20
Tabela 6 - Comparativo entre produção de alcalóides e organogênese <i>in vitro</i> (Misawa, 1994).....	21
Tabela 7 - Germinação de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. aferida aos 35 dias após terem sido submetidas a diferentes condições <i>in</i> e <i>ex vitro</i>	46
Tabela 8- Contaminação em sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam, dispostas em tubos de ensaio com meio de cultura com diferentes estádios de desenvolvimento:	46
Tabela 9 – Freqüência média de contaminação e calogênese em sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. aos 35 dias em meio contendo 9,04 µM de 2,4-D e de BAP.....	53
Tabela 10 – Freqüência média de calogênese observada aos 33 dias da cultura de pistilos de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. coletados antes e após antese das flores, em meio contendo 9,04 µM de 2,4-D e de BAP.....	54
Tabela 11 – Freqüência média de calogênese observada aos 35 dias da cultura de tegumento separado da semente de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. coletada 35 DAF ¹ , em meio contendo 9,04 µM de 2,4-D e de BAP.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Reguladores de crescimento, fontes de carboidratos, agentes gelificantes, misturas complexas e outras substâncias mais comumente usados na cultura de tecidos vegetais (adaptado de Souza, 2006).....	5
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégias gerais para produção de metabólitos secundários em cultura de células de plantas (Fumagali <i>et al</i> , 2008).....	19
Figura 2 – Ilustração das formas testadas de inserção das sementes no meio de cultura.....	42
Figura 3 - Massa fresca de sementes maduras de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam ao longo da embebição em rolo de papel contendo água estéril em quantidade (mL) 2,5 vezes a massa do papel (g).....	44
Figura 4 - Coloração das sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. pelo teste de tetrazólio após 3h em solução de 0,075%: (...).....	45
Figura 5 - Contaminação e germinação de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. maduras, sobre papel em diferentes recipientes.....	46
Figura 6 - Germinação normal em sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam coletadas na fenofase fruto verde indeiscente, dispostas em meio de cultura (...).....	47
Figura 7 - Germinação ao longo do tempo em função da posição de inserção da semente de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam no meio de cultura, independentemente do balanço de reguladores de crescimento (...).....	48
Figura 8 - Germinação de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam ao longo do tempo em função do balanço de reguladores de crescimento, independentemente da posição de inserção da semente (...).....	48
Figura 9 - Calogênese e germinação em sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam coletadas na fenofase fruto verde indeiscente, dispostas em meio de cultura contendo diferentes combinações entre 2,4-D ou ANA e BAP, (...).....	49
Figura 10 - Calogênese e germinação em sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam coletadas na fenofase fruto verde indeiscente, de cultura dispostas em meio de cultura, aos 35 dias independente do balanço de reguladores (...).....	49
Figura 11 - Calogênese de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. no meio de cultura independentemente do balanço de reguladores, ao longo de 173 dias de cultura, em função da posição de inserção da semente (...).....	50
Figura 12 - Calogênese em função de diferentes combinações de reguladores de crescimento, independentemente da posição de inserção da semente <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. no meio de cultura.....	51
Figura 13 - Germinação e calogênese em sementes <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento e dispostas em meio de cultura sem reguladores de crescimento.....	51

Figura 14 - Germinação de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. sobre ponte de papel em tubo de ensaio (fotos 1 e 2) e cultura do embrião em meio nutritivo sem reguladores (fotos 3, 4, 5 e 6), notar desenvolvimento anômalo do embrião.....	52
Figura 15 - Calogênese em <i>Caesalpinia echinata</i> Lam a partir de diferentes tipos de explante (...).	53
Figura 16 - Calos formados diretamente em tegumentos isolados das sementes, submetidos ao tratamento indutor de calogênese. (...).	55
Figura 17 - Calogênese a partir de semente imatura de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. como explante inicial da cultura em meio indutor (...).	56
Figura 18 - Calogênese a partir de semente imatura de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. como explante inicial da cultura em meio indutor(...).	57
Figura 19 - Geminiação de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. em tubo de ensaio sobre meio de cultura com balanço de reguladores indutor de calogênese (...).	57
Figura 20 - Diversidade morfológica observada na calogênese de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (...).	58
Figura 21 – Formação de novas células em cultura de longa duração de calos de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (...).	59
Figura 22 - Esquema geral da amostragem para avaliação de variação somaclonal na cultura celular <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.....	67
Figura 23 - Porção do gel de poliacrilamida corado por nitrato de prata após eletroforese: a) bandas monomórficas de boa resolução; b) bandas de baixa resolução; c) amostra com amplificação deficiente.....	70

LISTA DE ABREVIASÕES E SÍMBOLOS

IVG: índice de velocidade de germinação

MS: meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)

μ M: micromolar

mL; mililitro

L: litro

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 - Cultura de Tecidos Vegetais.....	3
2.3 - Marcadores Moleculares.....	10
2.4 - Fitofármacos.....	14
2.5 - Conservação e alterações do germoplasma vegetal.....	22
2.6 – Referências Bibliográficas.....	28
3 - CAPÍTULO I – Indução e manutenção de calogênese <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.....	37
3.1-Resumo.....	38
3.2-Abstract.....	39
3.3-Introdução.....	40
3.4-Material e Métodos.....	41
3.4.1-Limpeza superficial dos explantes, manipulação asséptica e meio de cultura.....	41
3.4.2-Delineamento experimental e avaliações.....	42
3.5-Resultados e discussão.....	44
3.6-Conclusões.....	59
3.7-Recomendações de pesquisa.....	60
3.8-Referências bibliográficas.....	61
4 - CAPÍTULO II - Aplicação do método AFLP para avaliação da estabilidade genética ao longo da cultura celular <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.....	63
4.1-Resumo.....	64
4.2-Abstract.....	65
4.3-Introdução.....	66
4.4-Material e Métodos.....	67
4.4.1-Coleta, tratamento e armazenamento das amostras.....	67
4.4.2-Extração e quantificação do DNA total.	67
4.4.3-Reações da AFLP.....	68
4.4.4-Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	68
4.4.5-Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata e análise dos resultados.....	69
4.5-Resultados e discussão.....	69
4.6-Conclusões.....	71
4.7-Recomendações de Pesquisa.....	71
4.8-Referências bibliográficas.....	71

1-INTRODUÇÃO GERAL

A *Caesalpinia echinata* Lam (pau-brasil, pau-de-pernambuco ou ibirapitanga) é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, que durante muito tempo forneceu seu pigmento vermelho, a brasileína, para tingir os tecidos de nobres europeus e foi muito usada também na construção naval, civil e de mobiliário, sendo intensa a sua exploração no período do descobrimento até 1835 (Chu *et al.*, 2003). O declínio do comércio do pau-brasil deu-se a partir de meados do século XIX com a síntese do primeiro corante artificial em 1856, a malveína, por William H. Perkin (Rezende *et al.*, 2004). Outros ciclos econômicos sucederam a exploração do pau-brasil e promoveram a drástica redução do Bioma Mata Atlântica, que devido à alta diversidade florística, está incluído entre os cinco maiores ecossistemas do mundo em número de espécies, sendo considerado um “hot spot” de biodiversidade (Barbedo *et al.*, 2002). A *Caesalpinia echinata* Lam figura nas listas de espécies ameaçadas de extinção do IBAMA (Brasil, 2008) e na Red List of Threatened Species elaborada pela União Mundial para Conservação (IUCN, 2008). Atualmente o pau-brasil é usado na arborização urbana, na recuperação e restauração de ecossistemas e na confecção de instrumentos musicais. Ressalta-se que a exemplo de outras espécies do mesmo Bioma, pode despertar atenção por se constituir em potencial fonte de substâncias químicas de interesse, conforme podemos vislumbrar pelos resultados de Silva (2006) e a investigação de Rezende *et al.* (2004), que identificaram nas sementes da espécie, uma proteína de uso terapêutico.

A *Caesalpinia echinata* Lam é uma espécie hermafrodita, alógama autocompatível, polinizada por abelhas e insetos pequenos, com dispersão autocórica, mais precisamente barocórica (Pinâ-Rodrigues, Freire, Silva, 2007). A sua propagação por sementes é dificultada pela rápida perda do poder germinativo (Endres *et al.*, 2007). Na floresta úmida estima-se que cerca de 70% das espécies produzem sementes com comportamento recalcitrante ou intermediário (Barbedo *et al.*, 2002), o que dificulta o armazenamento e consequentemente a conservação *ex situ*. Lima, Peixoto, Pereira (2002), destacam que a manutenção de organismos fora de seu ambiente natural, *ex situ*, faz parte de uma estratégia global, não devendo ser vista como um fim, em si mesma, mas como um meio, oferecendo fonte de material genético para a reintrodução em *habitats* danificados e aumento de populações, que é parte do manejo de um ecossistema.

A cultura de tecidos é considerada uma técnica importante para a propagação de várias espécies lenhosas (Landa *et al.*, 2000 apud Santos *et al.*, 2004). Withers e Williams (1998) consideraram atraente a possibilidade da conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas, principalmente para clones singulares, genótipos estéreis ou com sementes recalcitrantes. Venturieri e Venturieri (2004) descrevem a calogênese como uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática, considerando que também é útil quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o estabelecimento, proliferação e manutenção *in vitro* de células de *Caesalpinia echinata* Lam, a partir de diferentes explantes e condições de cultura, correlacionando-os à possível ocorrência de variação somaclonal ao longo do tempo e do número de subculturas. A aplicação das técnicas de cultura de tecidos à cultura desta espécie se justifica pela sua condição de espécie ameaçada que apresenta dificuldades no armazenamento de suas sementes, e a cultura celular (calos) permite a

conservação de genótipos via organogênese e embriogênese indireta, além de possibilitar estudos sobre a síntese de compostos químicos valiosos do ponto de vista biotecnológico. Este trabalho buscou contribuir com o aumento do conhecimento para aplicação da cultura de tecidos como técnica alternativa complementar ao processo de conservação *ex situ*, e para estudos sobre a síntese de substâncias de interesse terapêutico, tal como a CeKI - *Caesalpinia echinata kallikrein inhibitor* (Silva *et al*, 2004).

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Cultura de Tecidos Vegetais

Conforme apontado por Santana (2004), vários autores deixaram suas contribuições a respeito do emprego da palavra biotecnologia, enumerando muitas definições sobre o termo. Entretanto pode-se conceituar biotecnologia de forma bastante simplória, mas não menos elucidativa, a partir do significado de suas duas “raízes” etimológicas. A palavra “*Bio*” como elemento designativo de vida e “*Tecnologia*”, no sentido de solucionar problemas ou gerar produtos úteis. Considerada dessa forma, a biotecnologia, senso estrito, pode ser definida como toda a tecnologia que gera produtos ou utiliza processos de origem biológica. Gonzalez, Filho, Córdoba (2008), especificam biotecnologia como um conjunto amplo de tecnologias que incluem a utilização, alteração controlada e melhoramento¹ de organismos vivos ou suas partes, células e moléculas, para a geração de produtos, processos e serviços, aplicados em diversos setores, como saúde, agroindústria e meio ambiente. Guerra e Nodari (2006) afirmam que uma das principais características das biotecnologias modernas é a abrangência ampla e seu caráter multidisciplinar, e ressaltam que, conforme recomendado pela FAO, sua inserção nas diferentes sociedades deve ser culturalmente aceita e tecnicamente factível para a realidade de desenvolvimento técnico-científico de um país, proporcionando benefícios mensuráveis aos destinatários, além de segurança ambiental e sócio-econômica.

O histórico das descobertas e da aplicação da biotecnologia, conforme sugere Santana (2005), resume a evolução desta ciência em três períodos distintos. O primeiro período é marcado pela arte de cruzar espécies de plantas e animais e pelo uso de leveduras e técnicas de fermentação para produção do pão e do álcool, que se inicia nos primórdios da civilização, e avança até o século XIX. Mendel e Louis Pasteur se destacam nominalmente neste período, dentre tantos anônimos empíricos, ao desvendar os princípios científicos das práticas cotidianas de agricultores, padeiros e cervejeiros. Conforme descrito pela autora, a geração seguinte se inicia com a identificação do DNA como material genético e posteriormente, com a elucidação de sua estrutura helicoidal. No terceiro e último período destaca-se a descoberta da possibilidade de isolamento e inserção de genes de um organismo no genoma de outro organismo. Nesta revisão tratamos o termo “biotecnologia moderna” fazendo referência a este último período, e “biotecnologia clássica”, também chamada “convencional”, referindo-se a todo o primeiro e segundo período de sua evolução. Desse modo, podemos afirmar que a cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta da “biotecnologia clássica”, indispensável para algumas importantes aplicações da “biotecnologia moderna”.

A expressão “cultura de tecidos vegetais” abrange uma série de técnicas, mediante as quais um explante² é cultivado em um meio nutritivo, normalmente designado como “meio de cultura”, sob condições controladas de temperatura e luminosidade (Souza *et al*, 2006). Os mesmos autores afirmam que dentre os diversos procedimentos biotecnológicos, sem dúvida alguma, este é o ramo da biologia celular que mais êxito alcançou, inclusive por ser aquele que vem sendo estudado há mais tempo. A cultura de tecidos vegetais se mostra muito muito útil para importantes processos de transformação genética (Merkle e Nairn, 2005). Plantas transgênicas, cultivos mono e pluricelulares e imobilizações celulares ou enzimáticas são as

¹ Os autores empregam o termo no sentido utilizado pela agricultura moderna.

² Explante é o nome dado ao “fragmento” de tecido, órgão ou estrutura vegetal utilizado como propágulo para início ou manutenção de culturas de tecidos vegetais, que também pode ser representado por células individuais ou agrupadas, quando se considera algumas técnicas específicas que serão tratadas ao longo do texto.

três técnicas que se destacam cada vez mais na biotecnologia vegetal (Gonzalez, Filho, Córdoba, 2008).

A cultura de tecidos vegetais está baseada no mesmo princípio da propagação vegetativa, que tem sua base fisiológica apoiada na teoria da totipotência vegetal, fenômeno representado pela capacidade potencial de células ou tecidos vegetais formarem todos os tipos de células e/ou regenerar plantas inteiras (Valois, Salomão, Allem, 1996). A teoria da totipotencialidade foi proposta por Schleiden, em 1838, e Schwann, em 1839, conforme descreve Gautheret (1983), citado por Torres, Caldas, Ferreira (1998). Os mesmos autores ressaltam que o insucesso de Gottlieb Haberlandt, ao tentar comprovar esta teoria em 1902, deveu-se provavelmente ao uso da baixa densidade de inóculo, oriundo de tecidos “maduros”, de espécies pouco adequadas, recalcitrantes à cultura *in vitro*, mas principalmente, devido à ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura. A generalização do dogma da totipotencialidade não tem sido facilmente demonstrada, conhecendo-se muitas espécies cuja capacidade regenerativa não foi ainda evidenciada na prática (Kerbauy, 1999; Costa, Souza e Almeida, 2006).

A cultura axênica de plantas é iniciada a partir de uma grande variedade de procedimentos para limpeza dos explantes. Comumente a palavra “desinfestação” é utilizada para designar o processo de remoção, por variados meios, de microrganismos, não necessariamente patogênicos, que estão localizados superficialmente nos explantes, sendo o termo “desinfecção” mais utilizado para tratamentos que atinjam também contaminantes endofíticos. Alguns textos utilizam o termo “assepsia”, quando, salvo melhor juízo, o termo menos inadequado seria “anti-sepsia”, apesar de inapropriado pelo propósito do processo, de não se restringir a organismos patogênicos, visto que a competição por nutrientes e mesmo espaço físico nos recipientes de cultivo, praticamente igualam todos os microorganismos em termos de prejuízo à implantação e condução da cultura. Através de protocolos simples e complexos, utiliza-se de uma vasta gama de recursos e substâncias químicas, de acordo com a natureza do tecido vegetal utilizado, que além da contaminação superficial, também apresenta as de origem interna, como bactérias e fungos endofíticos (Sarasan *et al*, 2006). Os mesmos autores citando Pence (1996), afirmam que a redução deste tipo de contaminação a níveis aceitáveis pode ser alcançada pela incorporação de fungicidas e bactericidas no meio de cultura.

A situação do desconhecimento do repertório de variáveis e do ambiente fisiológico ideal, necessários para o desenvolvimento normal de célula à planta, intensifica a procura de formulações que possam simular com êxito a vida celular (Carvalho, 2003). Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas, Haridasan, Ferreira, 1998). As diferenças metabólicas e o potencial de desenvolvimento são estabelecidos e mantidos por influências mútuas das células e dos tecidos entre si, e em algumas células são relativamente estáveis (Kerbauy, 1999). A retirada de um explante de um organismo íntegro, e sua colocação no meio de cultura que contêm nutrientes e reguladores de crescimento, trazem como consequência a liberação de suas células do controle ao qual estavam submetidas nesse organismo, expondo-as a uma nova condição, onde a capacidade de divisão pode ser readquirida (desdiferenciação) e o genoma pode expressar-se de outras formas, conduzindo-as a novos padrões de diferenciação (Handro, Floch, 1990). Conforme descreve Kerbauy (1999), a desdiferenciação celular é a perda da especialização e a reversão da célula diferenciada a um estado “meristemático”. O mesmo autor afirma que o processo de diferenciação celular reflete, em

última análise, o efeito de pelo menos três grupos de fatores: 1) fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades que pode ser expresso durante o desenvolvimento do vegetal; 2) características originadas durante a ontogênese, que embora sejam inicialmente respostas regulares aos estímulos ambientais, quando estabelecidas, tendem a se manter de forma estável e permanente e 3) características cuja expressão depende apenas do ambiente.

A composição e concentração de reguladores de crescimento são os fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, e além destes e dos nutrientes essenciais (macro e micronutrientes), o meio de cultura pode conter vários compostos orgânicos (Quadro 1), que são adicionados para suprirem também as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (Costa, Souza e Almeida, 2006).

Quadro 1 - Reguladores de crescimento, fontes de carboidratos, agentes gelificantes, misturas complexas e outras substâncias comumente usados na cultura de tecidos vegetais (adaptado de Souza, 2006).

REGULADORES DE CRESCIMENTO	
Auxinas	
Ácido 3-indolacético – AIA	
Ácido naftalenoacético – ANA	
Ácido indolbutírico – AIB	
Ácido 2,4-diclorofenoxyacético – 2,4-D	
Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico – Picloram	
Citocininas	
6-Benzilaminopurina ou 6-Benziladenina – BAP	
6-Furfurilaminopurina ou Cinetina – KIN ou CIN	
Isopenteniladenina – 2iP	
Zeatina – ZEA	
Tidiazuron – TDZ	
Outras categorias	
Gibelrelinas – GA (mais comum GA ₃)	
Ácido Abscísico – ABA	
Etileno – Ethephon ou Ethrel	
FONTES DE CARBOIDRATOS	
Frutose, glicoses, manitol, sacarose, sorbitol	
AGENTES GELIFICANTES	
Agar, Agarose, Amido	
MISTURAS COMPLEXAS	
Água de coco, caseína hidrolisada, extratos vegetais.	
ANTIOXIDANTES	
Carvão ativado, polímeros diversos	

Dentre os objetivos da cultura de tecidos de plantas, a “micropopulação³” é o de maior impacto na agricultura, principalmente por permitir a produção de genótipos superiores em larga escala, isentos de patógenos (Souza e Junghans, 2006). A propagação *in vitro* baseia-se na morfogênese, que é o processo mediante o qual as células tornam-se progressivamente especializadas tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional e cujas diferenças na expressão desse potencial se devem, de alguma maneira, à natureza e ao grau de diferenciação dos tecidos utilizados (Kerbauy, 1999). Conforme Costa, Souza e Almeida (2006), atualmente são considerados dois padrões morfogenéticos que ocorrem *in vitro*: 1) morfogênese direta, que ocorre quando novos órgãos ou embriões se originam diretamente do explante e 2) morfogênese indireta, quando há prévia formação de células não diferenciadas, de proliferação contínua e desordenada, chamadas comumente de “calos”, anteriormente ao desenvolvimento de estruturas organizadas. Em muitas espécies, a regeneração via calogênese é mais vantajosa que a regeneração direta para a transformação de plantas, sendo mais efetiva para a seleção de plantas transgênicas (Hong *et al*, 2007). Calos são um importante material para diversos métodos de transformação de plantas, incluindo os mediados por *Agrobacterium tumefaciens* e os denominados “biológicos”, mas também são largamente utilizados em estudos celulares de resposta a diferentes estresses (Yang *et al*, 2007 citando diversos autores).

A formação de órgãos indiretamente, passando pela fase de calo, depende dos estádios de desdiferenciação, competência, indução e determinação dos tecidos utilizados (Costa, Souza e Almeida, 2006). Guerra e Nodari (2006) definem competência celular como a capacidade das células reagirem a sinais específicos e expressar um potencial inerente, sendo que esta habilidade pode envolver a rediferenciação (modelos diretos) e a iniciação de uma resposta particular de diferenciação a partir de desdiferenciação (modelos indiretos), sendo que a indução está associada a processos de (re)entrada no ciclo celular. Costa, Souza e Almeida (2006). interpretam a competência como a capacidade do explante em responder a estímulos específicos, sendo um estado transitório onde as células podem ser induzidas à “determinação”. O termo “determinação” tem sido empregado por alguns autores para designar a canalização progressiva, observada durante a ontogênese das células em direção a vias particulares de desenvolvimento, que tornam as células gradativamente especializadas, com restrições no seu potencial de desenvolvimento, sendo que este estado é estável e pode ser transmitido de forma intacta durante muitas gerações celulares, fenômeno denominado por Brink em 1962 de herança somática (Kerbauy, 1999). Desse modo comprehende-se o porquê de mesmo em explantes mais homogêneos quanto à sua constituição histológica, ser possível observar respostas distintas a estímulos iguais (Costa, Souza e Almeida, 2006). Vale ressaltar que a homogeneidade histológica citada pode ser apenas aparente, visto que diferentes condições fisiológicas e mesmo gradientes de ploidia já foram descritas em tecidos histologicamente homogêneos (Handro e Floh, 1990). As diferenças observadas entre calos oriundos de mesmo tecido sugerem também que a divisão celular pode ser induzida nas células maduras antes de estas terem sido totalmente desdiferenciadas (Kerbauy, 1999).

Os ápices caulinares e as gemas axilares são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro*, pois possuem determinação para o crescimento vegetativo e podem se desenvolver mais facilmente em novas plantas (Gattapaglia e Machado, 1998). A cultura de ápices caulinares, equivocadamente chamada de cultura de meristemas, pode ser

³ “micropopulação” é um termo etimologicamente impreciso, mas comumente utilizado para qualquer processo que através de técnicas de cultura de tecidos vegetais originem novas plantas a partir de explantes que não necessariamente apresentem dimensões condizentes com o prefixo “micro”.

utilizada para propagação de plantas *in vitro*, recuperação de plantas livres de vírus, conservação, intercâmbio de germoplasma e transformação de plantas (Torres, Teixeira, Pozzer, 1998). Conforme relatam Torres, Caldas, Ferreira (1998) ocorreu a disseminação do termo “meristem”, utilizado equivocadamente por Morel & Martin (1952) no trabalho pioneiro da cultura de ápices caulinares, com o intuito de recuperar plantas livres de contaminantes endógenos, no caso em questão, o vírus do mosaico em clones de dália. Entretanto esta técnica está usualmente associada ao crescimento do domo apical (túnica e *corpus*) de uma brotação, sem as folhas primordiais (Guerra e Nodari, 2006). Em geral, espécies perenes, lenhosas, tais como fruteiras e essências florestais apresentam dificuldades para regeneração a partir de ápices caulinares, sendo a microenxertia empregada com êxito para recuperação de plantas destas espécies livres de doenças (Paz e Pasqual, 1998). Noleto e Silveira (2004) concluem que as principais dificuldades encontradas para micropregar espécies arbóreas podem ser atribuídas às condições fisiológicas nos explantes oriundos de plantas adultas. O escurecimento dos tecidos e do meio de cultura é também um problema comum ao êxito da iniciação das culturas em grande número das plantas, principalmente lenhosas, e decorre da liberação de substâncias, principalmente fenóis, a partir de injúrias mecânicas nas células do explante, sendo também encontrados em meio de cultura de algumas espécies lenhosas, taninos e flavonóides (Guerra e Nodari, 2006). No Royal Botanic Gardens, Kew, UK (RBG Kew), esse problema é controlado em muitas espécies pela adição de carvão ativo e Polivinilpirrolidona (PVP) (RBG Kew, *unpublished results apud* Sarasan *et al*, 2006).

Ápices radiculares também podem ser utilizados para regeneração de novas plantas. Kerbauy (1999), citando diversos artigos, descreve que ápices radiculares de certas orquídeas, quando cultivados em meios relativamente simples, originam diretamente embriões somáticos (protocormóides). Gattapaglia e Machado (1998), citando diversos autores, afirmam que meristemas florais são interessantes para micropregação, pois são facilmente revertidos para o estado vegetativo sem passar pela fase de calo, havendo fortes indícios de que estas estruturas são morfogeneticamente competentes no início de seu desenvolvimento, podendo servir de fonte de explantes com alto grau de juvenilidade para a cultura de espécies lenhosas. Os mesmos autores descrevem que foi na década de 1970 que Murashige apresentou o conceito de estágios no processo de propagação *in vitro*. Guerra e Nodari (2006), descrevem que cada estágio apresenta objetivos, pressuposições e necessidades específicas em termos de composição dos meios de cultura, tipo e balanço dos reguladores de crescimento e condições físicas como luz, temperatura, fotoperíodo, e as condições laboratoriais para cada estágio podem ser otimizadas.

O estado sanitário da planta matriz pode inviabilizar o estabelecimento *in vitro* e sua condição fisiológica tem grande influência no posterior comportamento das culturas, especialmente em espécies lenhosas, pois com a passagem do estado juvenil para o adulto, ocorre uma série de alterações na capacidade morfogenética dos tecidos, sendo marcante na reatividade inicial dos explantes à cultura *in vitro* e na fase de enraizamento (Gattapaglia e Machado, 1998). Os mesmos autores afirmam que teoricamente qualquer tecido pode ser utilizado como explante, mas na prática procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecidos meristemáticos, o que representa maior capacidade de expressar a totipotência. É importante destacar que a principal preocupação com a cultura de tecidos de plantas perenes, neste sentido, está no declínio da competência para organogênese e outros processos de regeneração em plantas com a maturação dos tecidos (Huang *et al*, 1990). A aclimatização da planta regenerada, para condições *ex vitro* representa uma etapa crítica na propagação *in vitro*. As plantas podem apresentar alterações fisiológicas e morfológicas que

prejudicam sua adaptação ao novo ambiente. As principais precauções a serem adotadas dizem respeito à desidratação dos tecidos e a susceptibilidade a patógenos.

Dentre as estruturas organizadas que podem ser regeneradas por via direta ou indireta, encontram-se também embriões somáticos, que de acordo com Jiménez, (2001) é atualmente a melhor forma conhecida de induzir regeneração através da cultura de tecidos vegetais, sendo ainda um bom modelo para estudos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, visto que provê quantidade suficiente de embriões homogêneos para as análises. Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Willians e Maheswaran, 1986 *apud* Guerra, Torres e Teixeira, 1998). Diversas angiospermas, incluindo algumas espécies frutíferas lenhosas, têm a capacidade de produzir naturalmente embriões adventícios a partir de tecidos relacionados ao sistema reprodutivo, sendo mais comum na forma de poliembrionia nucelar (Litz et al., 1984; Litz, 1984 *apud* Barros, 2004). A expressão "cultura de embriões" também pode ser empregada para descrever o cultivo do embrião, seja ele zigótico, somático, originário do pólen (androgênese), da oosfera não fertilizada ou de outras células do saco embrionário. É comum o emprego do embrião gamético como explante inicial, para superar dormência de sementes, imaturidade do embrião, presença de substâncias inibidoras no endosperma, estudar aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento da estrutura embrionária, para testar viabilidade de sementes, recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis e também como fonte de tecido com elevada totipotência, sendo este último uso bastante frequente (Hu e Ferreira, 1998). Klink *et al* (2008) descrevem o desenvolvimento da embriogênese somática em seis estágios: (1) indução, (2) proliferação, (3) histodiferenciação, (4) maturação, (5) dessecção e (6) germinação e conversão, cuja duração é genótipo dependente.

Outra técnica que tem sido bastante utilizada é a cultura de ovários, que fornece um sistema controlado para estudo dos aspectos nutricionais e fisiológicos da formação de sementes, do desenvolvimento de frutos, considerado por alguns autores como sistema modelo para estudos do processo de maturação, podendo ainda ser usado como método para propagação de plantas, indução de haplóides partenogênicos e recuperação de híbridos (Torres, Guerra e Ferreira, 1998). A partir da cultura de pólen também é possível obter plantas haplóides, que naturalmente ou após tratamento com colchicina se tornam diploides (2n), sendo homozigota para todos os *loci* (dihaplóide) o que pode facilitar e acelerar programas do melhoramento genético clássico.

A regeneração de plantas tem sido obtida em trabalhos de cultura *in vitro* por meio de balanço hormonal e de condições de incubação adequadas, sendo que na "micropropagação" é desejável que a identidade genética do genótipo seja mantida. Em algumas técnicas, como a suspensão celular (cultura de calos em meio de cultura líquido), isso não é garantido, visto que é comum a ocorrência de variantes somacloniais (Cid, 1998). Apesar deste aspecto, culturas em suspensão e em biorreatores têm sido estabelecidas para promover a otimização de sistemas de propagação, tornando-os mais competitivos economicamente (Winkelmann *et al*, 1998a; Hohe *et al*, 2001 *apud* Borchert *et al*, 2007). A suspensão celular é iniciada a partir da transferência de calos friáveis para um meio líquido, sob condição de agitação continua, para evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura, que deve ser constantemente renovado com o mesmo propósito, visto que sua composição e características (ex: pH) podem afetar o padrão de diferenciação, lignificação e/ou alongamento, divisão, envelhecimento ou senescência na suspensão celular, cujo objetivo precípua é à obtenção e

proliferação de células para diversos propósitos, sejam acadêmicos e/ou comerciais (Arnison e Boll, 1976 *apud* Cid, 1998). O mesmo autor afirma que o crescimento da população celular em suspensão, avaliada geralmente através de contagem de células, modificações no volume, no diâmetro, na matéria fresca e/ou seca, apresenta diversas fases: 1) Fase de latência, onde não há modificações significativas com relação ao inóculo inicial, sendo desejável que seja a mais curta possível; 2) Fase exponencial, com intensificação das divisões celulares em função do tempo; 3) Fase de platô, representando a diminuição da atividade mitótica e estabilização da massa seca; 4) Fase de senescência, que é resultado de interações núcleo-citoplasma-meio externo, resultando em ativação ou não, da transcrição de alguns genes, que ao que tudo indica, estariam envolvidos na interrupção "programada" das divisões da célula eucariótica. É essencial que as células em suspensão se multipliquem ativamente, independentemente do propósito a que se destina a cultura, que pode ser nas áreas de: 1) bioquímica, auxiliando o estudo e isolamento de enzimas, permitindo a obtenção de material celular uniforme, livre de clorofila e lignificação; 2) fisiologia vegetal, onde é comumente utilizada para estudo de fatores de divisão celular, do crescimento, da senescência, da resistência a fatores abióticos (ex: frio, metais pesados) e da organogênese e embriogênese somática; 3) fitopatologia, no estudo de resistência a toxinas fúngicas; 4) genética de plantas, utilizada nos estudos sobre poliploidia celular, mutações e transformação genética de plantas; e 5) produtos biotecnológicos, principalmente com biorreatores visando à produção de metabólitos secundários ou material clonal em escala comercial (Cid, 1998).

Em propagação de plantas é de interesse a manutenção da integridade genética das plantas matriz, a cultura de tecidos, que "via de regra" produz "clones", atende a este requisito, no entanto também pode induzir variação genética, denominada somaclonal. Em termos gerais as variações somaclonais em plantas são principalmente resultantes das "condições não-naturais" da cultura de tecidos *in vitro* (Carvalho, 2003). A variação somaclonal é decorrente de mudanças complexas, que se manifestam em vários níveis, incluindo fenotípicos, citológicos, bioquímicos e genéticos/epigenéticos (Kaeppeler *et al* 2000 *apud* Guo *et al*, 2007). A epigenese é a ativação seletiva e diferencial de genes (reprogramação celular, como no caso representativo da transição da fase nuvenil para a fase a adulta em plantas intactas (Guerra e Nodari, 2006). As bases moleculares da variação somaclonal ainda não são precisamente conhecidas, tendo sido sugerido que ocorrem ambos os mecanismos, tanto genéticos quanto epigenéticos (Oh *et al*, 2007). As evidências disponíveis apontam para a existência de porções do genoma que poderiam ser "moduladas" quando as células estivessem sob o "estresse", que podemos considerar ser uma condição intrínseca a cultura de tecidos vegetais *in vitro* (Oh *et al*, 2007). Como resposta à estas condições, o desenvolvimento celular, permeado por níveis diferenciados de estresse, é normalmente comprometido pelos efeitos colaterais da cultura, nos quais o ciclo de duplicação e divisão do material genético é um dos eventos mais afetados (Carvalho, 2003). Vários tipos de mutações têm sido descritos para variantes somaclonais, incluindo mutações de ponto, duplicação de genes, rearranjos cromossomais, e ainda, mudanças no número de cromossomos (Kaeppeler *et al*, 2000, Peschke and Phillips 1992, Phillips *et al*, 1994, *apud* Oh *et al*, 2007).

Plantas micropropagadas não idênticas geneticamente à planta matriz foram detectadas por Larkin e Scowcroft em 1981, conforme descreve Souza *et al* (2006), que afirmam que a ocorrência de variação somaclonal é indesejável do ponto de vista da produção de mudas, preservação e intercâmbio de germoplasma, porém, cria variabilidade que potencialmente pode ser de interesse para o melhoramento genético. Dentre as técnicas para obtenção de variabilidade genética, a indução de variação somaclonal pode permitir a manipulação de

grandes populações de células, sob condições ambientais controladas e em espaço reduzido (Brito *et al*, 2007). Pontaroli e Camadro (2005) ressaltam que após a seleção *in vitro* dos genótipos de interesse, é essencial que se identifique e caracterize as condições que favorecem a variação somaclonal. A seleção *in vitro* pode atuar no melhoramento de plantas por meio da obtenção direta de genótipos de interesse ou, ainda, pela redução da população a ser selecionada no campo, e ambas as estratégias promovem o aceleramento de programas de melhoramento de plantas (Evans *et al*, 1984 *apud* Brito *et al*, 2007). A variação somaclonal tem particular relevância para plantas perenes e árvores visto que os processos tradicionais de melhoramento requerem muitos anos para seleção (Skirvin *et al*, 1994 *apud* Palombi *et al*, 2007). O desenvolvimento de estratégias seletivas eficazes e a avaliação da eficiência da seleção *in vitro* são etapas indispensáveis para que sua aplicação seja vantajosa em programas de melhoramento (Brito *et al*, 2007), nos quais o conhecimento da quantidade e distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações dos materiais utilizados é de extrema importância para o delineamento de estratégias ideais, visando maximizar os ganhos genéticos das características de interesse (Wendt *et al*, 2007). A propagação *in vitro* pode ser usada conjuntamente com marcadores moleculares para incrementar a eficiência de produção de genótipos selecionados no melhoramento genético (Hormaza 1999 *apud* Pijut *et al*, 2007).

A possibilidade de alterações genéticas induzidas pelo processo de cultura de tecidos é merecedora de especial atenção quando o objetivo é o uso da técnica para multiplicação de genótipos selecionados ou conservação de germoplasma (Gagliardi *et al*, 2007). A reorganização genômica que pode ocorrer é classificada como um mecanismo adaptativo, ativado sob estresse, cujos pontos preferenciais (do inglês *hot-spots*) de mutação e a possibilidade de recorrer a alelos alternativos é coerente com esta resposta, sendo limitada a uma sub-fração do genoma (Oh *et al*, 2007). Muitos trabalhos têm sido realizados para compreender a natureza das modificações genéticas decorrentes da variação somaclonal e vários resultados mostram a complexidade deste fenômeno (Cassels and Curry 2001; Larkin *et al*, 1989; Predieri 2001 *apud* Palombi *et al*, 2007). Existem relatos, para várias espécies, especialmente com prolongados períodos de cultura de calos, que apresentam significativas taxas de instabilidade genética, inclusive poliploidia e aneuploidia (Ezura and Osawa 1994; Oh *et al*, 1995; Kubalakova *et al*, 1996; Nayak and Sen 1997 *apud* Borchert *et al*, 2007).

2.3-Marcadores Moleculares

Conforme destacam Palombi e Damiano (2002) existem muitas estratégias para detectar variação genética, entretanto muitas mudanças induzidas *in vitro* não podem ser observadas por padrões morfológicos, fenotípicos ou alteração na atividade biológica. A variabilidade genética pode ser detectada por marcadores moleculares em plantas regeneradas por cultura de tecidos (Vendrame, Kochert, Wetzstein, 1999). O desenvolvimento de sistemas marcadores moleculares tornou-se um importante complemento para o melhoramento genético clássico em populações de espécies lenhosas, especialmente no que tange ao conhecimento da biologia reprodutiva, estrutura populacional e à identificação de genes que afetam caracteres quantitativos, relacionados ao crescimento, a forma e a características da madeira (Pijut *et al*, 2007). Nos últimos anos, com os avanços da genética e da biologia molecular foram desenvolvidas poderosas técnicas de marcadores moleculares e há um elevado número de artigos científicos que descrevem o uso destes marcadores no estudo de várias espécies e com os mais diversos propósitos (Faleiro, 2007).

Gattapaglia e Ferreira (1995) definem como marcador molecular todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não de DNA, que pode ser caracterizado como marcador genético-molecular quando se correlaciona e produz progênie obedecendo à proporções da genética clássica. Ao longo destes 20 anos de genômica, diferentes tipos de marcadores, baseados no DNA, têm sido usados para construção de mapas genéticos, para análise da diversidade genética, mapeamento de caracteres, e diagnósticos específicos (Salem *et al*, 2007). Marcadores moleculares têm sido muito usados para avaliar a fidelidade genética de plantas propagadas *in vitro* (Gagliardi *et al*, 2007) e alguns destes têm sido aplicados para este propósito, destacando-se o RAPD (do inglês *random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), e microsatélites (SSRs, do inglês *simple sequence repeats*), conforme descrevem Palombi e Damiano (2002). Polimorfismo designa as diferenças genéticas entre alelos de um mesmo locus e entre indivíduos de uma população, causadas por variações nas seqüências de bases do DNA (Caixeta *et al*, 2009). Faleiro (2007) ao descrever as principais aplicações de marcadores genético-moleculares em programas de conservação, afirma que estes permitem gerar grande quantidade de informações sobre a identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos genéticos de determinado germoplasma.

A primeira tecnologia que foi empregada para mapeamento de genomas de plantas foi a RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), mas foi a partir da tecnologia denominada PCR (*PCR-Polymerase Chain Reaction*), que foram desenvolvidas técnicas como RAPD (do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*), que são rápidas, menos onerosas e não requerem conhecimento prévio da sequência de informação no DNA em análise (Agarwal *et al*, 2008). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que merece destaque, pois permite que qualquer porção do DNA seja muito amplificada, em um período relativamente curto, que envolve a separação das duas fitas da dupla-hélice por aquecimento e a adição de um iniciador (*primer*) para uma seqüência de DNA selecionada, desse modo, as fitas são expostas a uma DNA polimerase, resistente à temperatura, conhecida com *Taq* polimerase (obtida da bactéria *Thermus aquaticus*, originalmente encontrada em fontes termais no Parque de Yellowstone), que utiliza os nucleotídeos adicionados na solução, e catalisa a síntese da nova fita a partir de cada iniciador (Raven, Evert, Eichhorn, 2007). O desenvolvimento da amplificação de segmentos do DNA via PCR abriu o caminho da mudança no paradigma genético básico, da inferência do genótipo a partir do fenótipo, para a análise direta da variação na sequência de DNA, o que representa a transição entre a genética Mendeliana e a Genômica (Gattapaglia, Ferreira, 1995). Faleiro (2007) e Caixeta *et al* (2009), citando diversos autores, ainda referem-se a outros tipos de marcadores genéticos, cujos princípios são os mesmos ou semelhantes aos dos que foram acima descritos.

Agarwal *et al* (2008) afirma que a detecção e análise de variação genética podem ajudar na compreensão das bases moleculares de vários fenômenos biológicos, e sugerem que para ser considerados ideais os marcadores moleculares devem: (1) ser polimórficos e estar bem distribuídos ao longo de todo o genoma; 2) fornecer adequada resolução das diferenças genéticas; 3) gerar marcadores múltiplos, independentes e confiáveis; 4) ser simples, rápido e pouco oneroso; 5) necessitar de pequena quantidade de amostra de DNA; 6) apresentar poder de correlação para distinção de fenótipos; 7) não requerer conhecimento prévio do genoma do organismo avaliado. Podemos afirmar, com base em Gattapaglia e Ferreira (1995) e no levantamento de literatura que os marcadores mais frequentemente utilizados para os mais diversos propósitos são as Isoenzimas, RFLP, RAPD, Microssatélites e AFLP.

Uma das maneiras mais usuais para se estudar a expressão diferencial de genes nos diversos organismos, bem como em diferentes tecidos de um mesmo organismo, ou em estágios diferentes do desenvolvimento dos tecidos *in vivo* ou em condições *in vitro*, é através da análise de proteínas e/ou de enzimas ou, mais especificamente, de isoenzimas (Machado, Collet e Mangolin, 1999). Isoenzimas⁴ é a denominação dada a compostos protéicos que desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas e ser separadas por processos bioquímicos, sendo que a premissa básica adotada é que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças ao nível de sequências de DNA que codificam tais enzimas (Gattapaglia e Ferreira, 1995). Entretanto como produtos primários dos genes, os padrões ou fenótipos polipeptídicos dos organismos devem refletir a atividade dos genomas nos diversos organismos, tecidos, grupos de células, mas também refletem diferentes estádios de desenvolvimento dos tecidos com o mesmo genótipo (Machado, Collet e Mangolin, 1999).

O polimorfismo no comprimento de fragmentos (RFLP) é evidenciado pela fragmentação do DNA através de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (Gattapaglia e Ferreira, 1995). Surgiu no início da década de 1970, após a descoberta das enzimas de restrição por Linn e Arber (1968) e Meselson e Yuan (1968), e foi o primeiro marcador que permitiu detectar diferenças entre indivíduos diretamente no DNA. As variações ou polimorfismos detectados por RFLP decorrem da criação ou eliminação de sítios de restrição, devido à substituição ou modificação de par de bases (mutação), ou ainda, em razão de rearranjos dos segmentos de DNA por efeito de deleções, inserções, inversões ou translocações ocorridas nas fitas de DNA que alterem a distância entre dois sítios de restrição adjascentes (Caixeta *et al*, 2009). Nesta técnica o DNA pode ser extraído e qualquer parte do organismo vegetal, inclusive de DNA ribossomal (rDNA), mitocondrial (mtDNA) e de cloroplastos (cpDNA) (Faleiro, 2007). Após clivados os fragmentos são separados por eletroforese são transferidos para uma membrana de náilon ou de nitrocelulose (carregada positivamente), sendo fixados covalentemente na membrana por meio de alta temperatura sob luz ultra-violeta e posteriormente hibridizados com uma sonda radioativa ou quimioluminescente, complementar ao fragmento de interesse (Caixeta *et al*, 2009). Os mesmos autores destacam que esta é uma técnica que não permite automação de suas etapas, o que torna difícil a geração de grande volume de dados o que, aliado a inexistência de uma biblioteca de sondas para espécies de menor importância econômica ou menos pesquisadas, dificulta o emprego da técnica.

A técnica RAPD teve seu uso iniciado em meados da década de 1980, após a descoberta, por Kery Mulis, de um processo simples e eficiente de multiplicar, *in vitro*, e em escala exponencial, a quantidade de DNA de uma amostra (Caixeta *et al*, 2009). O fragmento de DNA a ser amplificado por esta técnica deve estar entre duas regiões do genoma complementares ao *primer*, separadas por até 4.000 pares de bases (pb) e em orientações opostas (Caixeta *et al*, 2009). A técnica RAPD se baseia na amplificação do DNA, o que resulta em várias vantagens práticas, que podem ser resumidas em simplicidade e rapidez (Gattapaglia e Ferreira, 1995). As bases moleculares do polimorfismo revelado pela RAPD podem ser mutações de ponto no sítio de pareamento do *primer*, que impedem consequentemente a amplificação e também por deleções e inserções entre estes sítios de pareamento (Caixeta *et al*, 2009). Gagliardi *et al*, 2007 afirma que esta técnica tem sido bastante usada para detectar alterações moleculares em plantas regeneradas *in vitro*,

⁴ Machado, Collet, Mangolin, 1999 também utilizam o termo “isozima” para designar isoenzima.

apresentando a vantagem de não haver necessidade do conhecimento prévio do genoma para seu uso (Fischer *et al*, 2000; Klinbunga *et al*, 2000 *apud* Salem *et al*, 2007). A principal limitação dos marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por locus, sendo apenas um alelo detectado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo, ou seja os genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos por RAPD, esta limitação denomina-se dominância dos marcadores (Gattapaglia e Ferreira, 1995).

Diferentes experimentos no início dos anos 80 demonstraram que os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de sequências repetidas (microssatélites), umas mais complexas e outras mais simples (Gattapaglia e Ferreira, 1995). Os mesmos autores afirmam que tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo e são muito mais frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. A existência de técnicas mais acessíveis, não justifica a magnitude do investimento necessário para o desenvolvimento de marcadores SSR, e refletem a baixa freqüência do seu uso para detecção de variação somaclonal. Pijut *et al* (2007), visto que exige pessoal especializado e equipamento sofisticado para o sequenciamento (Gattapaglia e Ferreira, 1995).

A técnica AFLP tem se mostrado uma ferramenta muito eficiente para caracterizar variação somaclonal, para identificação de cultivares ou ainda para redução da redundância na conservação de coleções de germoplasma (Gagliardi *et al*, 2007 citando diversos autores), pois combina os princípios dos marcadores RFLP e RAPD (Faleiro, 2007). A metodologia envolve as etapas de: 1) digestão do DNA genômico total, com duas enzimas de restrição; 2) ligação de adaptadores com seqüência conhecida nas duas extremidades de cada fragmento, com tamanho de 80 a 500pb; 3) amplificação seletiva de um conjunto de fragmentos usando *primers* de seqüência complementar a do adaptador, seguida de seqüência específica do sítio de restrição da enzima e uma extensão de nucleotídeos seletivos na extremidade 3' (Caixeta *et al*, 2009). Os mesmos autores destacam que as enzimas mais comumente utilizadas são a *EcoRI* e a *MseI*, que apresentam “corte” raro (sítio de restrição com seis a oito bases) e freqüente (sítio de restrição de quatro bases), respectivamente, o que gera três tipos de fragmentos, ou seja, com duas extremidades “cortadas”: 1) pelas enzimas de corte raro; 2) de corte freqüente e 3) de corte raro e freqüente, sendo que a possibilidade de usar outras combinações de enzimas de restrição diferentes (ex; *PstI*, *SseI*, *SdAI*), permite manipular o número de fragmentos gerados para amplificação e obter perfil eletroforético com a complexidade desejada.

Os marcadores microssatélites são especialmente sensíveis e efetivos para pesquisas de identificação de origens e estabilidade de culturas *in vitro* e das plantas regeneradas por esta técnica, especialmente no monitoramento de mutação somática em longos períodos de armazenamento, sendo que as técnicas RAPD e AFLP são usualmente empregadas quando dados sobre seqüências específicas não estão disponíveis Pijut *et al* (2007). Entretanto há artigos, que ao comparar o uso de microssatélites com outros marcadores, notadamente RAPD e AFLP, como fizeram Palombi e Damiano (2002), sugerem que SSR deveria ser melhor avaliado para o propósito de detectar variação somaclonal. Variação somaclonal foi constatada por RAPD em plantas de beterraba e *Triticum tauschii* regeneradas *in vitro*, entretanto, foi observada em muito baixos índices (menor que 1%), na embriogênese somática *in vitro* de Abeto da Noruega, conforme descrevem Kiss *et al*, (2001). Estes mesmos autores, citando diversos outros autores, concluem que o fato de RAPD não ter evidenciado diferenças

entre DNA de árvores haplóides⁵ e aneuplóides, confirma a suposição de que AFLP é um método mais poderoso para aplicação na análise de variação somaclonal. Venkatachalam *et al* (2007), utilizando-se as técnicas RAPD e inter simple sequence repeats (ISSR), também não encontraram variação somaclonal em plantas de bananeira micropropagadas, processo que é citado na literatura como de freqüente ocorrência de variação somaclonal.

O desencadeamento de todos os tipos de mudanças pode ser representado por "choques" no genoma ou na plasticidade, que ocorrem após a planta estar exaurida, como resposta ordinária a estresses ambientais (Cullis 1999 *apud* Oh *et al*, 2007). Através dos marcadores moleculares é possível inferências sobre a diversidade genética e as inter-relações entre organismos a nível de DNA, sem as interferências do ambiente (Agarwal *et al*, 2008). É significativo número de metodologias e aplicações da genética molecular, e embora exista grande número de marcadores, o princípio da análise é o mesmo: marcadores comuns aos acessos genéticos significam semelhança e não-comuns, significam diferenças genéticas (Faleiro, 2007). Entretanto é importante ressaltar que apesar de marcadores moleculares serem utilizados comumente para comprovar fidelidade genética (clonagem) na cultura de tecidos vegetais, alterações epigenéticas são pouco pesquisadas, sendo a metilação do DNA detectada pela análise da presença 5-methyl-deoxycitosa (5-mdC), composto relacionado a alterações na conformação de fatores de transcrição e outras proteínas na molécula de DNA de plantas e animais (Valledor *et al*, 2007).

O progresso obtido na compreensão das bases moleculares da variação somaclonal, tem sido importante para a manipulação genética via transgênicos, para seleção de mutantes e para micropropagação *in vitro* (Guo *et al*, 2007). Algumas vezes, mudanças genéticas massivas e reproduzíveis, como as observadas na variação somaclonal, oferecem a possibilidade de identificar variantes específicos no DNA, sejam estruturais ou não, que podem ser usados para monitorar o genoma ao longo do processo de propagação *in vitro* (Oh *et al*, 2007). O uso de marcadores moleculares baseados no DNA tem mudado de modo significativo o entendimento da genética vegetal, e podem ser usados de diversas maneiras para aperfeiçoar os esforços de manejo e conservação dos recursos genéticos vegetais (Salem *et al*, 2007). O uso destas ferramentas moleculares na cultura de tecidos vegetais, também se dá no controle de qualidade na micropropagação em larga escala de plantas medicinais, representando um importante instrumento para garantir a segurança e eficácia da transformação do material vegetal bruto em produtos farmacêuticos de interesse (Liu *et al*, 2008). O aumento do uso de recursos vegetais induz ao aprimoramento de estratégias que disponibilizem matéria-prima uniforme, de forma contínua e neste contexto se destaca a cultura de tecidos vegetais (Simões, 2009).

2.4-Fitofármacos

Plantas têm sido tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas (França, 2004). Além do metabolismo básico as plantas produzem metabólitos secundários, tais como alcalóides, fenóis, flavonóides e terpenóides, dentre outros, que além de atrair polinizadores, as protegem da ação de fatores bióticos e abióticos, e têm despertado a atenção por suas atividades biológicas ou terapêuticas úteis (Viana *et al*, 2004). Metabolismo pode ser definido como o conjunto de reações

⁵ Haplóide é o organismo ou célula que possui somente um conjunto completo de cromossomos (n); Poliplóide e Aneuploide possui um número de cromossomos diferentes do múltiplo exato do monoplóide ou do número básico (Lam-Sánchez, Oliveira, Lam, 1992).

químicas que estão continuamente ocorrendo nas células, que visam, primariamente, o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais (energia, poder redutor, macromoléculas essenciais), que é denominado metabolismo primário, e aquelas que ocorrem em menor escala, não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo, mas que garantem vantagens para sobrevivência e perpetuação da espécie, e são consideradas como metabolismo secundário (Santos, 2004). A mesma autora descreve uma definição ligeiramente diferente, apresentada por Gottlieb *et al* (1996), que apenas diferenciam os metabólitos primários como sendo fornecedores de matéria-prima e de energia para formação dos metabólitos secundários, designados por estes autores como "especiais". As plantas possuem uma série de enzimas e acumulam uma grande quantidade de metabólitos que são de enorme interesse, muitos dos quais são produzidos pelas plantas em baixa concentração, ou em vegetais de crescimento lento, para os quais a extração para uso industrial implicaria, provavelmente, na extinção da espécie em um período razoavelmente curto de tempo (Gonzalez, Filho, Córdoba, 2008). As três famílias de moléculas principais que constituem os metabólitos secundários são os compostos fenólicos, terpênicos, esteróides e os alcalóides (Fumagali *et al*, 2008).

Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, parte dos fármacos permanece sendo obtida a partir de matérias-primas vegetais, seja pela dificuldade técnica ou pela inviabilidade econômica da síntese de moléculas com mesma estereoquímica, inclusive para fármacos sintéticos, ou seja, que não ocorrem na natureza, e cuja obtenção foi facilitada ou tornou-se economicamente viável, somente a partir da descoberta de substâncias vegetais que puderam ser utilizadas no seu processo de síntese como precursores (Schenkel *et al*, 2004). Os mesmos autores revelam que os vegetais são fornecedores de matérias-primas farmacêuticas constituindo: 1) as substâncias ativas propriamente ditas (Tabela 1), responsáveis pela ação terapêutica, 2) os precursores da síntese destes compostos (Tabela 2) ou ainda 3) os adjuvantes (Tabela 3), que viabilizam a administração e manutenção da qualidade do medicamento.

Tabela 1 - Exemplos de fármacos obtidos a partir de matérias-primas vegetais (Schenkel et al, 2004).

Fármaco	Classe Terapêutica	Espécie vegetal
Artemisinina	Antimalárico	<i>Artemisia annua</i> L.
Atropina	Anticolinérgico	<i>Atropa belladonna</i> L.
Capsaicina	anestésico tópico	<i>Capsicum</i> spp.
Colchicina	Antirreumático	<i>Conchicum autumnale</i> L.
digoxina, digitoxina	glicosídeos cardíacos	<i>Digitalis purpúrea</i> L. D. <i>lanata</i> Ehrhart
escopolamina	Antiparkinsoniano	<i>Datura</i> spp.
emetina	Antiamebiano	<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes
estrofantina (ouabaína)	glicosídeos cardíacos	<i>Strophanthus</i> spp.
fisostigmina	Antiglaucosídeo	<i>Physostigma venenosum</i> Balf.
morfina, codeína	analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i> L.
pilocarpina	Antiglaucosídeo	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes
quinina	Antimalárico	<i>Cinchona</i> spp.
reserpina	anti-hipertensivo	<i>Rauvolfia</i> spp.
tubocurarina	bloqueador neuromuscular	<i>Chondrodendron tomentosum</i> Ruiz et Pav.
vimblastina, vincristina	antitumorais	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don

Tabela 2 - Exemplos de matérias-primas vegetais utilizadas na semi-síntese de fármacos (Schenkel et al, 2004).

Matéria-prima	Fármaco	Espécie vegetal
10-desacetilbacatina II	paclitaxel, docetaxel	<i>Taxus</i> spp.
diosgenina	hormônios esteroidais	<i>Dioscorea</i> spp.
hecogenina	hormônios esteroidais	<i>Agave</i> spp.
podofilotoxina	etoposídeo, teniposídeo	<i>Podophyllum</i> spp.
escopolamina	N-butilescopolamina	<i>Datura</i> spp.
estigmasterol	hormônios esteroidais	<i>Glicine max</i> (L.) Merr.
Catarantina e vindolina	vimblastina, vinorrelbina	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don

Tabela 3 - Exemplos de adjuvantes farmacêuticos de origem vegetal (Schenkel *et al*, 2004).

Adjuvante	Função principal	Fonte vegetal
amido e derivados	aglutinante e desagregante	<i>Zea mays</i> L. e <i>Solanum tuberosum</i> L.
celulose e derivados	aglutinante, desagregante, formador de gel, espessante, filmógeno, modificador da cedência	<i>Pinus</i> spp. <i>Eucalyptus</i> spp.
óleos fixos	veículo	<i>Arachys hypogea</i> L. <i>Olea europaea</i> L.
óleos voláteis (essenciais)	Adequadores e corretivos organoléticos	<i>Citrus</i> spp. e <i>Mentha</i> spp.
cera de carnaúba	excipiente de formas farmacêuticas semi-sólidas	<i>Copernicia prunifera</i> (Miller) H. E. Moore
esteviosídeo	Edulcorante	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni
sacarose	edulcorante, estruturador de xaropes, cobertura de drágeas	<i>Saccharum officinarum</i> L.
etanol	Veículo	<i>Saccharum officinarum</i> L.
goma guar, goma caraia	aglutinantes, formadores de gel, espessantes	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> Taub. <i>Sterculia tomentosa</i> Guill. Et Perr.
ácido algínico e derivados	aglutinante, dormador de gel, espessante	<i>Fucus vesiculosus</i> L.
pectinas	aglutinante, formador de gel, espessante	<i>Citrus</i> spp.
manteiga de cacau	base de supositórios	<i>Theobroma cacao</i> L.

Os metabólitos secundários extraídos a partir de plantas cultivadas no campo sofrem a influência de variações sazonais, pragas, doenças e condições metereológicas, desse modo, a utilização de técnicas biotecnológicas apresenta-se como um importante recurso alternativo para o estudo e o cultivo, atuando como fonte biológica contínua para a produção de fármacos (Viana *et al*, 2004). Fumagali *et al* (2008) ainda ressaltam que plantas originárias de biótipos específicos podem ter muitas dificuldades para crescer fora de seus ecossistemas locais e para evitar a coleta predatória e indiscriminada, as pesquisas visando a produção destes metabólitos secundários em cultura são vantajosas tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. Teoricamente as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* (Costa, Souza e Almeida, 2006). Em 1994, Misawa já afirmava que há um número considerável de produtos comerciais importantes que são extraídos de plantas no campo, mas podem ser obtidos a partir da tecnologia de cultura celulares. Um considerável esforço tem sido feito no intuito de produzir medicamentos fitoterápicos a partir de plantas com substâncias ativas que tenham sido acumuladas em culturas de células ou tecidos de plantas, entretanto os processos necessitam de estudos que incrementem o rendimento para viabilizar

economicamente o sistema, o que depende precipuamente do entendimento dos mecanismos, principalmente genéticos, para controle da biogênese e acúmulo de compostos bioativos (França, 2004).

O desenvolvimento de sistemas de cultura para produção de substâncias de interesse é relativamente simples, entretanto há limitações, principalmente pelo alto custo de biorreatores e a instabilidade das linhagens celulares cultivadas, que podem perder sua capacidade de produzir as substâncias de interesse ao longo do tempo de cultura (Galera *et al*, 2007). França (2004) cita Berlin (1988) ao descrever uma estratégia para iniciação de uma cultura de células e tecidos como fonte de compostos bioativos, que deve contemplar: 1) eleição de planta matriz com alto teor do composto-alvo; 2) estabelecimento do maior número de linhagens possível, a partir de diferentes partes da planta; 3) seleção de uma cultura que cresça bem e também produza de modo estável o composto de interesse; 4) desenvolvimento da cultura em suspensão das linhagens celulares aparentemente valiosas e; 5) checagem da manutenção das características superiores iniciais, em condições de cultivo em meio líquido, o que é essencial para posteriores explorações biotecnológicas. Fumagali *et al* (2008) afirmam que o uso de cultura de células de planta para a produção de substâncias químicas e medicamentos contribuiu grandemente para avanços em diversas áreas da fisiologia e bioquímica vegetal e o uso de ferramentas genéticas e o grande conhecimento atual sobre a regulação das vias do metabolismo secundário poderão fornecer a base para a produção destes metabólitos em níveis aceitáveis comercialmente. Costa, Souza e Almeida (2006) citando diversas referências, dão como exemplo o caso do ácido betulínico e seus derivados, que desempenham papel como inibidores da replicação do HIV e de tumores, além de serem antimaláricos e anti-inflamatórios, e cuja cultura de calos favoreceu a produção do bioativo com rendimento (mg/g de matéria seca) quatro vezes superior ao teor apresentado na planta intacta. A Tabela 4 apresenta a comparação entre teores de metabólitos secundários produzidos em cultura de tecidos vegetais e plantas inteiras.

Tabela 4 - Comparativo entre os teores de metabólitos secundários produzidos em cultura de tecidos vegetais (CTV) e em plantas inteiras (Misawa, 1994).

Composto	Espécie	Produtividade (% de matéria seca)		
		Planta	CTV	tipo de CTV
Shikonin	<u>Lithospermum erythrorhizon</u>	1,5	20	S
Ginsenoside	<u>Panax ginseng</u>	4,5	27	C
Anthraquinones	<u>Morinda citrifolia</u>	0,3	18	S
Ajmalicine	<u>Catharanthus roseus</u>	0,3	1,0	S
Rosmarinic acid	<u>Coleus blumeii</u>	3	15	S
Ubiquinone-10	<u>Nicotiana tabacum</u>	0,003	0,036	S
Diosgenin	<u>Dioscorea deltoidea</u>	2	2	S
Benzylisoquinoline Alkaloids	<u>Coptis japonica</u>	5 a 10	11	S
Berberine	<u>Thalictrum minor</u>	0,01	10	S
Berberine	<u>Coptis japonica</u>	2 a 4	10	S
Anthraquinones	<u>Galium verum</u>	1,2	5,4	S
Anthraquinones	<u>Galium aparine</u>	0,2	3,8	S
Nicotine	<u>Nicotiana tabacum</u>	2,0	3,4	C
Bisoclaurine	<u>Stephania cepharantha</u>	0,8	2,3	S
Tripdiolide	<u>Tripterygium wilfordii</u>	0,001	0,05	S

* s = suspensão celular; c = calo

Fumagali *et al* (2008) descrevem as estratégias gerais para produção de metabólitos em cultura de células de plantas (Figura 3).

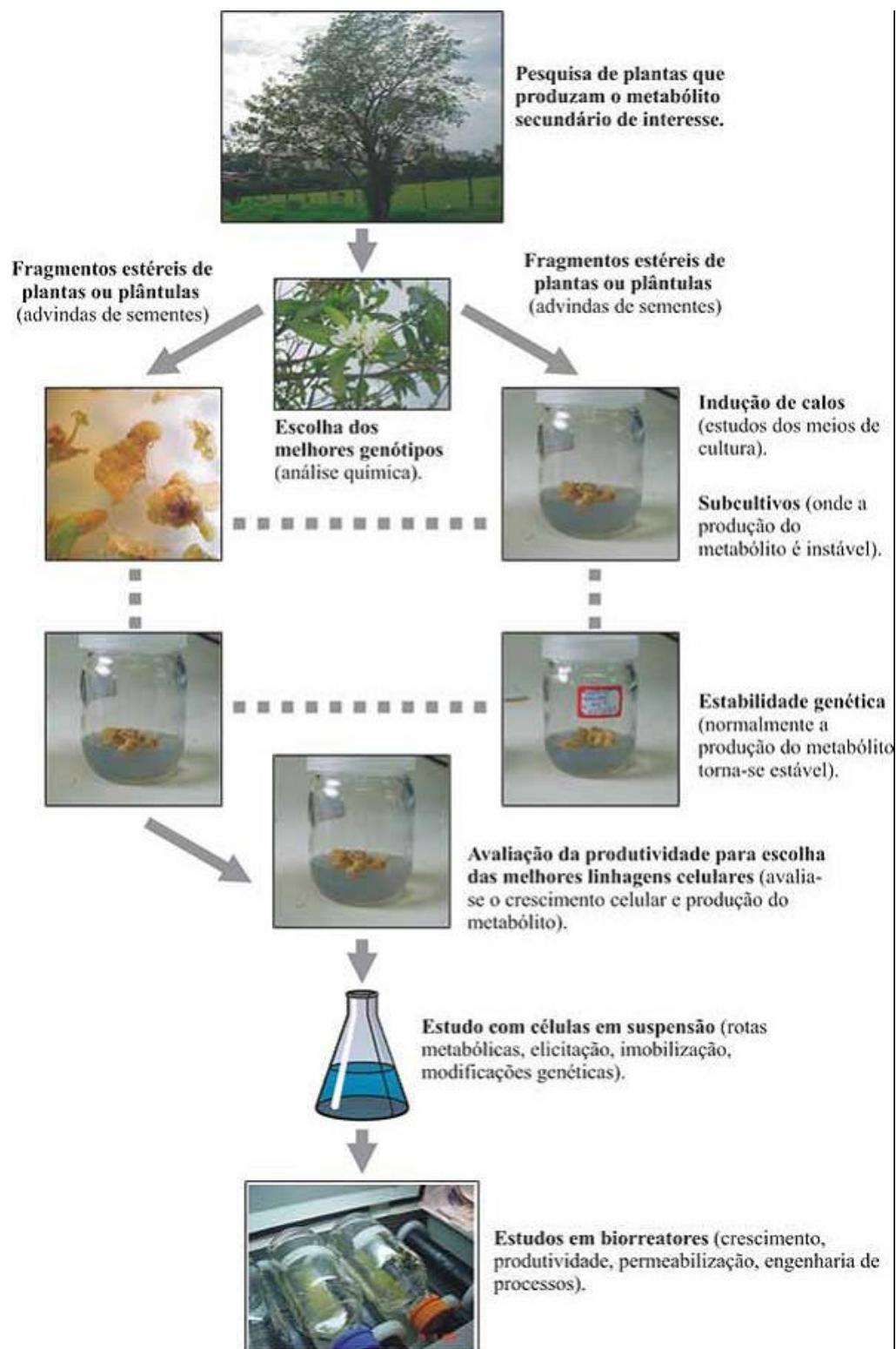


Figura 1 - Estratégias gerais para produção de metabólitos secundários em cultura de células de plantas (Fumagali *et al*, 2008).

A Tabela 5 demonstra a possibilidade de influenciar a produção do composto de interesse através da manipulação das condições de cultura. A interação entre plantas é bastante explorada em cultivos consorciados e o acúmulo de metabólitos secundários também pode ser afetado por esta interação, através da liberação de substâncias aleloquímicas e de modo similar, o co-cultivo *in vitro* de espécies medicinais pode resultar em interações positivas, induzindo aumento na produção de bioativos de interesse, conforme descreve França (2004), que cita como exemplo o co-cultivo de *Eclipta alba*, fonte de compostos da classe dos cumestanos, presente em formulações prescritas para tratamento da cirrose, com *Psychotria ipecacuanha* (sinonímia *Cephaelis ipecacuanha*), produtora de emetina e cefalina, com atividades emética, amebicida, expectorante. Neste co-cultivo, obteve-se rendimento de emetina quatro vezes maior que no cultivo isolado.

Tabela 5 - Efeito do meio de cultura na produção de células e de alcalóide (serpentina) na cultura *in vitro* de *Catharanthus roseus* (Misawa, 1994).

Meio de cultura	Produtividade em células g.ms / L	Serpentina (alcalóide) mg / L	Serpentina (alcalóide) % massa seca
Blaydes	7,6	4,4	0,06
Gamborg - B5; + 2,4-D: 1 mg/l	4,6	0,5	0,01
Gamborg + 2,4 D: 2 mg/l	5,2	0	0
Gamborg + NAA : 1.86 mg/l	7,6	1,2	0,02
Gamborg	5,1	0	0
Heller + IAA:O.175; BA: 1.13 mg/l	5,4	6,6	0,12
Linsmaier and Skoog	9,3	0	0
Murashige and Skoog	8,9	10,4	0,12
Nitsch and Nitsch	2,3	2,0	0,09
Velicky and Martin	5,0	0	0
White	0,8	0	0

*IAA=Ácido indol-3-acético; ANA=Ácido naftaleno acético; 2,4-D=ácido 2,4-Diclorofenoacético; Kin=Cinetina; BA = Benzilaminopurina

A cultura não organizada de células pode ser explorada para a produção de metabólitos secundários, no entanto, as células de calos representam um estádio fisiológico que na melhor das hipóteses, pode ser transiente na planta intacta e é diferente da maioria dos estádios celulares da planta diferenciada, desse modo o espectro de compostos produzidos é diferente daquele característico da planta (França, 2004). A organogênese na cultura *in vitro* pode ser vantajosa quando se verifica aumento significativo do teor de metabólitos produzidos em relação ao calo, havendo exemplos deste incremento em culturas de embriões, brotações e raízes, principalmente aquelas com inúmeras ramificações (“hairy roots”), que apresentam estabilidade genética e bioquímica, podendo ser submetidas a fermentação e responder a estímulos biológicos (microorganismos) e não biológicos (metais pesados, sacarídeos etc), e ainda são independentes do suprimento de auxina exógena (fenômeno denominado de “habituation”) quanto induzidas por *Agrobacterium rhizogenes*, que também é vetor para transformações genéticas (França, 2004). O início dos estudos sobre cultura de raízes isoladas confunde-se com a própria história da cultura de tecidos de plantas (Kerbauy, 1998). Muitos metabólitos secundários se acumulam em raízes, e sua coleta promove a destruição da

planta, desse modo existem inúmeros progressos no desenvolvimento de sistemas para cultura *in vitro* destas estruturas, havendo recentes avanços com sistemas de biorreatores que demonstram ser possível cultivar "hairy roots" em sistemas desenvolvidos tanto para pequena quanto para grande escala, e que apresentam um imenso potencial para a indústria farmacêutica (Guillon *et al*, 2006). A tabela 6 apresenta o comparativo entre os teores de alcalóide produzidos a partir de diferentes tecidos e órgãos usados como explantes.

Tabela 6 - Comparativo entre produção de alcalóides e organogênese *in vitro* (Misawa, 1994).

Tecido/órgão	Concentração do Alcaloide (% matéria seca)
Calo	$1,0 \cdot 10^{-2}$
brotações e calos	$1,5 \cdot 10^{-2}$
Brotações "Growing shoots"	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Raízes ramificadas "Hairy roots"	$3,0 \cdot 10^{-2}$
Folhas jovens de plantas	$1,0 \cdot 10^{-1}$
Folhas maduras de plantas	$1,0 \cdot 10^{-1}$

A manipulação genética juntamente com o estabelecimento de sistemas de regeneração de plantas *in vitro* facilita o estudo das vias de síntese de produtos do metabolismo secundário de plantas (Galera *et al*, 2007). Culturas de espécies medicinais transformadas têm sido estabelecidas em várias famílias botânicas e a expressão de um transgene em uma planta medicinal pode alterar o perfil de metabólitos produzidos, de forma que uma maior quantidade de um composto útil seja acumulada, como ocorreu com a produção de escopolamina em *Atropa belladonna*, que foi aumentada através de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* (França, 2004). Conforme descreve a mesma autora, o prognóstico acerca do sucesso da manipulação bioquímica ou genética do metabolismo de plantas é extremamente difícil, visto a existência de rotas metabólicas alternativas (plasticidade) e do controle coordenado por diversas enzimas em uma mesma rota metabólica, desse modo a transformação genética em plantas medicinais tem sido utilizada basicamente de duas formas: 1) com a introdução de genes que codificam novas atividades enzimáticas; 2) com a redução ou eliminação de atividades enzimáticas, para que alguns pontos de bifurcação de vias metabólicas e etapas catabólicas possam ser bloqueados e o fluxo direcionado para síntese de produtos de interesse.

A disseminação do uso de determinadas partes das plantas consideradas medicinais tem resultado em intenso extrativismo, colocando em risco de extinção inúmeras espécies nativas, causando distúrbios ecológicos e o desaparecimento de germoplasmas valiosos, cujo potencial farmacológico e químico não pôde sequer ser estudado (França, 2004). Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica, dentre os quais se destacam os fitoterápicos e os fitofármacos, e a magnitude da biodiversidade brasileira, com sua complexidade, onde se estima a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, apresenta muitas oportunidades para a identificação de produtos com possível utilização econômica, visto que esta possibilidade aumenta com a diversidade das espécies (Guerra e Nodari, 2004). Schenkel *et al* (2004) salientam a situação paradoxal das plantas medicinais brasileiras, consideradas como altamente promissoras, mas pouco conhecidas. Substâncias de uso medicinal, derivadas de plantas, constituem um

componente importante dos sistemas de saúde em países desenvolvidos (Galera *et al*, 2007). A produção de herbáceas medicinais, que apresentam curto ciclo de vida, não oferece maiores dificuldades, entretanto, a cultura de espécies arbóreas, que contêm substâncias bioativas, representa um desafio (França, 2004). Uma das prioridades da Convenção da Diversidade Biológica é estimular treinamentos para o desenvolvimento sustentado dos recursos biológicos nos países ricos em biodiversidade (Guerra e Nodari, 2004).

2.5 - Conservação e alterações do germoplasma vegetal.

A conservação de germoplasma vegetal visa guardar as espécies de plantas úteis, em condições seguras, permitindo sua utilização em pesquisas, no desenvolvimento de novas variedades e na sua recuperação, caso alguma catástrofe provoque o desaparecimento das variedades cultivadas (BRASIL, 2008). Basicamente, a conservação de recursos genéticos se dá de duas formas: 1) pela conservação *in situ*, que se refere à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural, em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas e 2) a conservação *ex situ* que é a conservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, através de coleções de plantas no campo, de sementes em bancos de sementes, ou de coleções *in vitro* (Santos, 2000). Baseado em dados da FAO (1998) estima-se que existem aproximadamente seis milhões de acessos de recursos genéticos vegetais em coleções *ex situ* no mundo todo, dos quais, mais da metade, apresentam-se redundantes, entre e dentro das coleções (Dobrovolskaya *et al*, 2005). "Bancos de genes", públicos e privados conservam diferentes tipos de germoplasma, incluindo as coleções base, de sementes, *in vitro*, de "produtos biotecnológicos" criopreservados, de pólen, de DNA, e no campo, dentre outras (Allem, 2001).

As espécies necessitam de um potencial de diversidade genética para continuidade da evolução, devido à constante mudança do ambiente biótico e à contínua adaptação das espécies frente ao regime de seleção dos seus predadores, hospedeiros, simbiontes e competidores (Frankel e Soulé 1981, *apud* Piña-Rodrigues *et al*, 2007). No Banco de Germoplasma-Semente da Embrapa-Cenargen estão sendo conservados mais de cem mil acessos de cerca de seiscentas espécies de cereais, leguminosas, forrageiras, oleaginosas, hortícolas, medicinais, florestais, nativas e exóticas.

A conservação *ex situ* faz parte de uma estratégia global, não devendo ser vista como um fim, mas como um meio, oferecendo fonte de material genético para a reintrodução em *habitats* danificados e aumento de populações, como parte do manejo de um ecossistema (Lima, Peixoto, Pereira, 2002). A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (Santos, 2000). As sementes são um valioso meio para conservação das espécies ditas ortodoxas, entretanto o armazenamento é impraticável para outras espécies que produzem sementes com comportamento denominado recalcitrante, que são viáveis somente por curtos períodos, ou ainda para as espécies que são propagadas predominantemente por meios assexuados (Bekheet, 2007). Muitas espécies produzem sementes ortodoxas, isto é, sementes que podem ser desidratadas e armazenadas em temperaturas baixas, prolongando sua longevidade, e por esta razão, estas condições de armazenamento são adotadas pela maioria dos bancos de sementes (Roberts, 1973 *apud* Santos, 2000). Entretanto, o mesmo autor afirma que numerosas espécies arbóreas e arbustivas, nativas de regiões tropicais e sub-tropicais, e muitas espécies cultivadas de importância econômica, tais como dendê (*Elaeis oleifera* [Kunth.] Cortes), côco da Bahia

(*Cocos nucifera* L.), borracha (*Hevea brasiliensis* M. Arg.) e cacau (*Theobroma cacao* L.), são danificadas e perdem a viabilidade quando armazenadas nestas mesmas condições, pois apresentam o comportamento denominado recalcitrante. Conforme descrevem Ellis *et al*, (1990) confirmados por Carvalho *et al* (2006), além dos grupos das sementes classificadas como ortodoxas e como recalcitrantes, há um terceiro grupo, no qual as sementes apresentam um comportamento de armazenamento intermediário ao ortodoxo e ao recalcitrante. Carneiro e Aguiar (1993) definem longevidade de sementes relacionando-a ao tempo em que se estas se conservam viáveis, e citando Popiningis (1997) afirmam que tal característica está correlacionada com as propriedades do tegumento e a própria composição química das sementes, sendo específica. Estes autores concluem que o processo de deterioração de algumas sementes não pode ser evitado, mas o grau de prejuízo pode ser controlado, o que concentra as pesquisas no controle da velocidade de deterioração de sementes no armazenamento.

Atualmente as sementes são classificadas em três categorias quanto ao seu comportamento durante a dessecação e no armazenamento: 1) sementes ortodoxas, que são as que toleram dessecação a baixos conteúdos de água (2% - 5%) e podem ser armazenadas em baixas temperaturas (-20 °C), condições que maximizam o tempo de armazenamento; 2) sementes intermediárias, que não toleram a dessecação a baixos conteúdos de água (10% - 12 %), mas que podem ser armazenadas a baixas temperaturas (geralmente acima de 0 °C); e 3) sementes recalcitrantes, comuns entre as espécies florestais da região tropical, as quais não toleram dessecação a baixos conteúdos de água (<12%), nem o armazenamento a baixas temperaturas (José *et al*, 2007 citando diversos autores). Essa variedade de comportamentos levou Melchior *et al* (2006) a corroborar Farrant *et al.* (1988) que propuseram a classificação das sementes anidrobióticas em “altamente”, “moderadamente” e “minimamente” recalcitrantes.

Carneiro e Aguiar (1993) ressaltam que o armazenamento atua como regulador de mercado, mas também é importante para conservação de recursos genéticos e para casos de produção irregular de sementes, abundantes em determinado ano e escassas em outros, o que considera condição bastante comum em espécies florestais. Marcondes *et al*, 2007, citando diversos autores, afirma que o potencial de conservação das sementes, determinado pela velocidade do processo de deterioração, pode ser variável entre diferentes lotes da mesma espécie ou mesma cultivar, armazenados sob as mesmas condições, visto que além dos fatores como temperatura e umidade relativa do ar no armazenamento, a própria qualidade fisiológica inicial das sementes influencia também a perda de vigor no armazenamento. A qualidade de sementes varia com as condições de produção, e o desenvolvimento de métodos de avaliação desta qualidade, permitem detectar com eficiência e rapidez as variações entre lotes (Costa e Moreira, 2006). Independentemente da existência de modelos matemáticos podem estimar a deterioração da qualidade fisiológica, mas que precisam ser ajustados a cada genótipo, as sementes armazenadas devem ser avaliadas periodicamente para verificar-se a necessidade de renovação do germoplasma conservado (Marcondes *et al*, 2007).

O método tradicionalmente usado para avaliar a qualidade fisiológica de sementes se baseia na realização do teste de germinação (Costa e Moreira, 2006). Convencionalmente se adota o teste padrão de germinação em amostras coletadas no acervo armazenado, conforme regras padrão (BRASIL, 1992). A germinação da semente é identificada pela protrusão do embrião através do tegumento e o processo se inicia com a absorção de água e termina com o início do alongamento do eixo embrionário. Após a embebição da semente, o tegumento hidratado amolece e se rompe, os tecidos de crescimento se desenvolvem com o

fornecimento de nutrientes pelos cotilédones, a radícula emerge e se “fixa” no substrato, as folhas começam a se formar, aumentando o potencial fotossintético da plântula e inicia-se a absorção de nutrientes do ambiente, os cotilédones sofrem abscisão e a planta passa a ser autotrófica (Lopes, 1998 citando diversos autores). No processo de germinação são reconhecidos basicamente dois padrões diferentes: 1) germinação “epígea”, quando o hipocôtilo alonga-se e curva-se para cima, levando os cotilédones para fora do solo, que se expandem desprendendo o tegumento; 2) na germinação classificada como hipógea, não há alongamento do hipocôtilo e os cotilédones se mantêm no interior do tegumento, sob a terra, a raiz primária penetra o solo para o fundo e o epicôtilo cresce para fora do solo emitindo as primeiras folhas (Floriano *et al*, 2004).

Martins *et al* (2002) ressaltam que o teste de germinação fornece condições favoráveis ao processo, o que possibilita que um lote expresse sua máxima germinação nessa condição, já os testes de vigor permitem identificar os lotes com maior ou menor probabilidade de apresentar melhor desempenho no campo ou durante o armazenamento. Alguns dos testes de vigor podem ser realizados conjuntamente com o teste de germinação, como a “primeira contagem de germinação”, que pode ser considerada um teste de vigor, pois se sabe que no processo de deterioração, a velocidade da germinação é um dos primeiros caracteres a ser afetado, e com base neste mesmo princípio pode-se avaliar o vigor de um lote pela precocidade da emissão da raiz primária, com grande eficiência, economia, praticidade e simplicidade (Martins *et al*, 2002). O teste de tetrazólio, aplicado com o mesmo propósito de avaliação do vigor, fundamenta-se na alteração da coloração dos tecidos da semente em presença de uma solução de sal de tetrazólio, o qual é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos (Fogaça *et al*, 2006). Neste teste, que vem sendo utilizado com êxito em espécies florestais, as sementes em contato com uma solução incolor de cloreto de tetrazólio (2,3,5 cloreto trifenil de tetrazólio), que é absorvida pelos tecidos, gera um composto de coloração vermelha estável e não solúvel, chamada formazan, por meio de enzimas do grupo das desidrogenases, presentes nos tecidos vivos, que não colore tecidos mortos, visto que nestes não há atividade dessas enzimas (Ferreira *et al*, 2007). A principal vantagem do método é a rapidez, entretanto precisa ser ajustado a cada espécie, quanto ao tempo de embebição necessário, à concentração e tempo de exposição à solução. Deve-se considerar que, por apresentar resultados mais rápidos do que os testes de germinação, o teste de tetrazólio constitui-se uma alternativa interessante para análise da qualidade de semente, principalmente para as espécies florestais que apresentam dormência, entretanto requer o conhecimento das estruturas das sementes a serem analisadas, alem da utilização de metodologia ajustada para cada espécie (Ferreira *et al*, 2007). A eficiência do teste de tetrazólio depende principalmente de sua adaptação para cada espécie, de modo a definir as condições apropriadas para a hidratação, o preparo, a coloração e a avaliação das sementes (Pinto *et al*, 2008). Outro teste indicado para avaliar o vigor de sementes é o de condutividade elétrica (Martins *et al*, 2002). Vidigal *et al* (2008) cita diversos autores ao constatar que o teste de condutividade elétrica é rápido e prático e que pesquisas recentes têm conseguido reduzir o tempo de embebição necessário, de 24 para até 2 horas. A condutividade elétrica medida na solução de embebição de sementes é função da quantidade de íons lixiviados, estando diretamente relacionado com a integridade das membranas celulares (Vidigal *et al*, 2008). Conforme Costa e Moreira (2006) o teste de condutividade elétrica é um dos métodos mais rápidos e eficientes utilizado para avaliação da qualidade de sementes, e se baseia no princípio de que a quantidade de eletrólitos liberada pela semente é diretamente proporcional à desorganização das membranas e de sua permeabilidade, que refletem o estado de deterioração da semente. Alguns fatores podem afetar os resultados do teste de condutividade elétrica, tais como: qualidade da água, temperatura e duração do

período de embebição, grau de umidade da semente, número de sementes testadas e genótipo (Vidigal *et al*, 2008 citando diversos autores). Na avaliação do vigor também é muito utilizado o teste chamado de envelhecimento acelerado, que é baseado no aumento da deterioração das sementes quando submetidas a condições adversas de alta temperatura e elevada umidade relativa, nas quais, sementes de baixa qualidade deterioram-se mais rapidamente do que sementes mais vigorosas, estabelecendo diferenças no potencial fisiológico das amostras avaliadas (Martins *et al*, 2002). Os mesmos autores destacam que métodos alternativos em espécies de sementes pequenas vêm sendo estudados, com a substituição da água por soluções saturadas de sais, visto que podem ser mais eficientes. Os testes de vigor têm sido amplamente divulgados e aceitos pela indústria de sementes como instrumentos para a tomada de decisões, complementando informações obtidas no teste de germinação (Teixeira *et al*, 2006).

A conservação *ex situ* também pode ocorrer em plantações no campo (*on-farm*), que é eficiente para a manutenção de coleções por curto e médio prazo, mas requer grandes extensões de terra e envolve altos custos de manutenção associados ao controle de pragas, ervas daninhas, propagação e fertilização, entre outras necessidades (Santos, 2000). O fato de plantas conservadas no campo estarem vulneráveis ao ataque de pragas, doenças e a desastres climáticos, os quais podem subitamente dizimar toda a coleção é um fator preocupante e, além disso, a manutenção de genótipos diferentes em um só local pode expor algumas linhagens a severo estresse fisiológico, causando redução no vigor e mesmo morte das plantas (Engelmann, 1991; Stushnoff, 1987 *apud* Santos, 2000). O mesmo autor revela que várias outras espécies de plantas necessitam de procedimentos de conservação alternativos, tais como as que se propagam exclusivamente por métodos assexuados e outras que: 1) não produzem sementes viáveis; 2) apresentam intensa heterozigosidade e elevada segregação, o que pode resultar na expressão de caracteres indesejáveis na população; 3) são espécies arbóreas de grande porte que demoram muitos anos para passar do estágio juvenil para o estágio adulto reprodutivo para as quais, é mais apropriado conservar outro propágulo que não a semente.

A criopreservação em nitrogênio líquido representa uma opção segura para conservação por longos períodos de germoplasma de sementes não ortodoxas, de espécies propagadas vegetativamente e de produtos biotecnológicos (Engelmann, 2004). O número de casos em que a criopreservação é aplicada com êxito tem crescido gradualmente, em especial para as espécies propagadas vegetativamente, mas também para sementes, embriões e ápices caulinares (Gonzalez-Arnau *et al*, 2008). Na criopreservação (-196°C), o material fica armazenado de maneira estável por animação suspensa, onde todos os processos metabólicos são inativados, havendo risco de danos cumulativos resultante da atividade de radicais livres, mas por suposição, não ocorrem mudanças significativas em função do tempo, sendo fortemente recomendável o uso de compostos que permitam a célula tolerar mudanças físicas e químicas, tanto decorrentes do congelamento, quanto do descongelamento (Withers e Williams, 1998 citando diversos autores). O estado da água e o equilíbrio osmótico definem o movimento da água dentro e fora das células e são parâmetros de particular importância para criopreservação, onde o processo de remoção da água desempenha um papel central na prevenção de injúrias pelo frio e a manutenção da viabilidade após o descongelamento (Gonzalez-Arnau *et al*, 2008). Compostos chamados “crioprotetores” agem por meio de modificações na permeabilidade de membranas, proteção de macromoléculas e inativação de radicais livres (Withers e Williams, 1998). O processo de cristalização da água durante o congelamento compreende basicamente três pontos críticos: 1) a nucleação (*nucleation*); 2) o desenvolvimento dos cristais e 3) a recristalização, que são os principais fatores que afetam a

sobrevivência das células submetidas a criopreservação, sendo tais processos evitados pelo fenômeno conhecido como “vitrificação”, que é um processo ocorrente em sistemas suficientemente concentrados por dessecação drástica em temperaturas não congelantes, com rápido resfriamento pela imersão direta em nitrogênio líquido, de forma que a viscosidade da solução intracelular aumente gradativamente tornando-se um líquido com propriedades mecânicas de um sólido, onde não ocorre a formação de cristais e virtualmente não há reações químicas (Gonzalez-Arnau *et al*, 2008).

Sarasan *et al* (2006) afirmam que a cultura *in vitro* de plantas tem sido cada vez mais usada na conservação de espécies em risco de extinção. As técnicas de preservação *in vitro* são particularmente valiosas para estas espécies, pois fornecem grande quantidade de material vegetal para as atividades inerentes à conservação de germoplasma. (Ashmore 1997 *apud* Gagliardi *et al*, 2007). Métodos eficazes de crescimento lento para armazenamento *in vitro* foram desenvolvidos para culturas de sistemas organizados, partes aéreas de várias espécies, de clima tropical e temperado, dentre as quais, batata, mandioca, batata-doce, maçã, pêra, morango, uva, kiwi, gramíneas, leguminosas forrageiras, crisântemos, musas e dioscorea, conforme descrevem Withers e Williams (1998). Os mesmos autores, ao citar diversas referências ressaltam que o uso de calogênese neste processo é limitado a curtos períodos e sob risco de geração de variantes somacloniais e de deterioração fisiológica, manifesta por crescimento deficiente e produção irregular ou baixa de compostos secundários, destacando que o valor das técnicas de conservação *in vitro* varia de acordo com a espécie, sendo sofisticação desnecessária para alguns genótipos e imprescindível para utilização de germoplasma valioso, nos casos em que técnicas convencionais são ineficientes. Santos (2000) citando Bajaj (1995) informa que numerosas espécies de importância econômica, tais como: café (*Coffea arabica* L.), morango (*Fragaria* spp.), banana (*Musa* spp.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.), batata (*Solanum* spp.), batata-doce (*Ipomea batatas*), vinha (*Vitis* spp.) têm sido conservadas com sucesso pelo uso da cultura de tecidos vegetais. A contaminação, tanto de origem exogéna quanto endógena, é um obstáculo para a cultura *in vitro* de plantas e particularmente importante para *taxa* ameaçados, cujas fontes de material na natureza são limitadas (Sarasan *et al*, 2006). O estabelecimento e a manutenção de culturas *in vitro* por períodos prolongados envolvem riscos que precisam ser minimizados pelo retardamento do crescimento das culturas, através de várias estratégias tecnicamente simples, como a redução da temperatura de incubação, o uso de retardantes de crescimento e a limitação da disponibilidade de oxigênio (Withers e Williams, 1998). A manutenção por longos períodos de coleções *in vitro* de plantas pode ser custosa, requerer muito trabalho de manipulação e condições controladas, e ainda não ser adequado para manter a fidelidade genética (Sarasan *et al*, 2006). A possibilidade de alterações genéticas induzidas pelo processo de cultura de tecidos é merecedora de especial atenção quando o objetivo é o uso da técnica para conservação de germoplasma (Gagliardi *et al*, 2007).

Algumas décadas após as primeiras experiências registradas com cultura de tecidos vegetais por Haberlandt no inicio do século XX, as técnicas da cultura *in vitro* deixaram o status de "curiosidade acadêmica" para se constituirem em um importante instrumento para todas as áreas da biologia pura e aplicada. O primeiro registro de aplicação prática da cultura de tecidos vegetais é de Morel e Martin (1952) ao recuperar plantas de dália livres de vírus do mosaico, por meio de cultura de ápices caulinares (Torres, Caldas, Ferreira, 1998). O domínio das técnicas de cultura *in vitro* de tecidos vegetais tem importância crucial, não apenas do ponto de vista de aplicações práticas, mas também na elucidação de muitas questões básicas relacionadas com a biologia, fisiologia, bioquímica e genética de plantas (Withers, 1982 *apud* Souza *et al*, 2006). Coleções *in vitro* oferecem diversas vantagens sobre

as coleções no campo, por causa do mínimo de espaço e manutenção requeridos (Bekheet, 2007).

A biodiversidade mundial está declinando em uma taxa sem precedentes, um total de 8.321 espécies foram incluídas pela *International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN)* na "Red List" de espécies ameaçadas, entre 1996 e 2004 (Sarasan *et al*, 2006), tendo como consequência inequívoca, o estreitamento da base genética dos recursos alimentares, de produção e biotecnológicos. A cultura de tecidos vegetais tem sido extremamente valiosa para a biotecnologia vegetal, especialmente na obtenção de clones, e é muito vantajosa para a preservação de genótipos para produção de compostos medicinais (França, 2004). Existem muitas dificuldades com a produção, manipulação e avaliação da qualidade fisiológica de sementes florestais, principalmente de espécies tropicais, no entanto é mais crítica a situação em função da produção aleatória, que torna ainda mais difícil a manutenção de estoques regulares, e da escassez de informações acerca de procedimentos capazes de ampliar o período de conservação (Martins e Lago, 2008). A estratégia ideal de conservação da biodiversidade deve envolver os métodos *in situ* e *ex situ* (Carvalho *et al*, 2006). Os métodos convencionais de conservação genética terão sempre seu papel, sendo mais benéfica uma estratégia equilibrada, avaliada caso a caso, na qual se complementem a conservação *in situ* e *ex situ*, pelo armazenamento de sementes, em bancos de germoplasma no campo (*on farm*), armazenamento *in vitro*, de pólen e até de DNA, em bibliotecas de genes (Withers e Williams, 1998).

Dentre as espécies vegetais que se destacam pela multiplicidade de benefícios gerados à sociedade, tanto tangíveis (produtos propriamente ditos) quanto intangíveis (valores ecossistêmicos), destacamos as espécies arbóreas tropicais. Ao supor as possíveis taxas de erosão genética promovidas pela drástica redução física dos biomas tropicais, que acolhem a chamada "megadiversidade", podemos imaginar a significativa perda de recursos valiosos, particularmente no caso da Mata Atlântica, que abriga a maior diversidade de espécies dentre as florestas tropicais no planeta. O uso da cultura de tecidos vegetais, como alternativa complementar à conservação de germoplasma de espécies arbóreas da Mata Atlântica, conforme ratificam as informações compiladas nesta revisão, não se apresentaria como uma sofisticação desnecessária, se justificando pelo grau de ameaça imposto a este ecossistema associado à dificuldade de conservação por métodos convencionais para uma quantidade considerável destas espécies.

A variabilidade genética é importante para a manutenção do equilíbrio necessário à recuperação de ecossistemas sob pressão. Desse modo, a cultura de tecidos vegetais, que por princípio, produz clones, não seria recomendada para este propósito, ainda mais considerando a notória dificuldade com a iniciação da cultura *in vitro* de espécies arbóreas, pelos altos índices de contaminação, baixa juvenilidade e oxidação de compostos fenólicos, quem impõem às espécies arbóreas tropicais o caráter de recalcitrância para a cultura de tecidos vegetais. Entretanto o uso de explantes oriundos de sementes facilita o controle de contaminações, garante fonte de tecidos "juvenis", menos sujeitos à síntese e oxidação de compostos fenólicos e teoricamente propiciam variabilidade genética de proporções análogas à obtida pelo propagação sexuada. Neste mesmo contexto a potencial ocorrência de variação somaclonal, que em princípio é desfavorável ao propósito da conservação de germoplasma selecionado, pode ser oportuna na produção de plantas com propósitos preservacionistas, principalmente nos casos em que há um severo estreitamento da base genética da espécie a propagar. Nestas condições, a variação somaclonal pode ser considerada um "mal desejável" ao "criar" variabilidade genética, importante não só para fins preservacionistas, mas também

necessária em alguns processos de melhoramento genético clássico. A variabilidade genética também pode ser obtida pela cultura de tecidos poliplóides e aneuploídes. O endosperma é um tecido triplóide ($3n$) em espécies diplóides. Esta característica é resultado da dupla fecundação, de dois núcleos polares do saco embrionário pelo núcleo espermático do pólen ($2n$ materno e $1n$ paterno), que ocorre na maioria das angiospermas (Lam-Sánchez, Oliveira, Lam, 1993) e pode ser usado como explante inicial, potencializando teoricamente a variação genética.

Considerando estes aspectos, a cultura de tecidos vegetais pode complementar, de forma alternativa, processos de conservação de germoplasma de espécies arbóreas tropicais que produzam sementes de comportamento recalcitrante ao armazenamento por longos períodos. A regeneração indireta via calogênese, a partir de explantes obtidos de sementes, se apresenta como o modelo mais adequado para este propósito, pois: 1) permite incrementar a recuperação de acessos cujas sementes, armazenadas ou não, apresentem baixo potencial germinativo; 2) de modo similar, pode ser utilizada na recuperação de cruzamentos incompatíveis, que inviabilizam o normal desenvolvimento do embrião ou sua germinação; 3) pode ser aprimorado para permitir maior longevidade *in vitro*, notadamente quando conjugado com técnicas de criopreservação; 4) pode ser conduzido através de processos automatizados, com cultura por suspensão celular em biorreatores; 5) pode prover células embriogênicas em larga escala; 6) a variabilidade genética, tanto definida pelo explante de origem como pela ocorrência de variação somaclonal, pode ser monitorada facilmente por técnicas de biologia molecular, e ser útil para algumas aplicações e, por fim, 7) facilita estudos para síntese e produção de substâncias químicas de interesse, principalmente em suspensão celular.

A evolução deste modelo de estudo, que pode ser promovida pelo interesse em “bioativos” de valor mercadológico, permitirá que a cultura de tecidos vegetais seja aplicada, mais intensamente, a outras espécies arbóreas tropicais que compartilham do mesmo *status* de ameaçada de extinção e da mesma dificuldade de conservação de germoplasma através de métodos convencionais. O volume e diversidade de fitoquímicos usados pela sociedade moderna, como drogas, nutrientes, aditivos de cosméticos e biopesticidas se expande continuamente (Georgiev *et al.*, 2007). Muitas espécies importantes para a preservação do Bioma Mata Atlântica podem ter seu potencial de uso biotecnológico (re)conhecido e, facilitar este processo é um passo importante para a produção industrial, via síntese orgânica ou “bioprodução” de compostos de interesse. Evitar a exploração predatória, integrar de forma complementar processos de conservação de germoplasma e “criar” variabilidade, potencialmente útil para restauração da base genética de espécies ameaçadas, consolidam o paradoxo do uso da cultura de tecidos vegetais, por princípio instrumento da propagação clonal, para propósitos que primem pela variabilidade genética.

2.6 - Referências Bibliográficas

AGARWAL, Milee; SHRIVASTAVA, Neeta; PADH, Harish. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Report*. 2008 27:617–631.

AGUIAR, Ivor Bergermann; PINÃ-RODRIGUES, Fátima C. Márquez; FIGLIOLIA, Márcia Balistiero (coords.). *Sementes Florestais Tropicais*. Brasília : Abrates, 1993. p. 335-350.

ALLEM, Antonio C. Managing genebanks: seed base collection examined. *Genetic*

Resources and Crop Evolution 2001. 48: 321-328.

BARROS, Levi de Moura. Embriogênese somática: Pré-requisito para o emprego de algumas técnicas de biotecnologia no melhoramento genético de plantas perenes. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 2004. p 36 – 39.

BEKHEET, S. A. In vitro Preservation of Globe Artichoke Germplasm. Plant Tissue Cult. & Biotech. 17(1): 1-9, 2007 (June).

BORCHERT, Thomas; FUCHS, Jorg; WINKELMANN, Traud; HOHE, Annette. Variable DNA content of *Cyclamen persicum* regenerated via somatic embryogenesis: rethinking the concept of long-term callus and suspension cultures. Plant Cell Tiss Organ Culture. 2007 90:255-263.

BRASIL. Conservação de Germoplasma Vegetal. Disponível em <http://www.cenargen.embrapa.br/antec/conservacao.html>. Acessado em 02/08/2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regras para análise de sementes*. Brasília, LANARV/SNAD/MA, 1992. 365 p.

BRITO, Lucila K. F. L. De; MOURA, Gioconda E. D. D.; MARTINS, Camila P.; ALOUFA, Magdi A. I.; MACEDO, Cristiane E. C.; LOPES, Daniela B.; BARROSO, Paulo A. V. Cultivo “in vitro” de somaclones de abacaxizeiro na presença de Nacl. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental. 2007. v.11, n.3, p.279-283,

CAIXETA, Eveline Teixeira, OLIVEIRA, Antonio Carlos Baião de Oliveira; BRITO, Giovani Greigh de; SAKIYAMA, Ney Sussumu. Tipos de marcadores moleculares in: Marcadores Moleculares. Editores BORÉM, Aluízio e CAIXETA, Eveline Teixeira. Universidade Federal de Viçosa, 2009. 532 pg.

CALDAS, Linda Styer; HARIDASAN, Padmaja; FERREIRA, Márcio Elias. Meios nutritivos. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas.. 1998 Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.

CARNEIRO, José Geraldo de Araújo; AGUIAR, Ivor Bergermann. Armazenamento de Sementes. In: Aguiar, Ivor Bergermann; Pinâ-Rodrigues, Fátima C. Márquez; Figliolia, Márcia Balistiero (coords.). Sementes Florestais Tropicais. Brasília : Abrates, 1993. p. 335-350.

CARVALHO, Letícia Renata de; SILVA, Edvaldo Aparecido Amaral da; DAVIDE, Antonio Claudio. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. Revista Brasileira de Sementes. 2006. vol. 28, nº 2, p.15-25,

CARVALHO, Carlos Roberto de. Citogenética e Variação Somaclonal. 2003. <http://www.bioteecnologia.com.br/biochat/artigos/artigo.asp?id=10> acesso em 03/02/2008.

CID, Luis Pedro Barrueto. Suspensão celular. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. 1998. Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH,

COSTA, Maria Angélica Pereira de Carvalho; SOUZA, Antônio da Silva; ALMEIDA, Weliton Antonio Bastos de. Morfogênese in vitro. in: SOUZA, Antônio da Silva e JUNGHANS, Tatiana Góes. Editores. Introdução à micropropagação de Plantas. Cruz das Almas; Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

COSTA, Paula de Souza Cabral; MOREIRA, Maria Laene de Carvalho. Teste de condutividade elétrica individual na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea arabica* L.). Ciênc. agrotec., Lavras, v. 30, n. 1, p. 92-96, jan./fev., 2006.

DOBROVOLSKAYA, O.; SALEH, U.; MALYSHEVA-OTO, L.; RODER, M. S. BORNER, A. Rationalising germplasm collections: a case study for wheat. *Theor Appl Genet* (2005) 111: 1322-1329.

ENGELMANN, Florent. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40:427-433, September-October 2004.

FALEIRO, Fábio Gelape. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF - Embrapa Cerrados, 2007.

FERREIRA, Robério Anastácio; OLIVEIRA, Luciana Magda de; TONETTI, Olívia Alvina Oliveira; DAVIDE, Antonio Cláudio. Comparação da viabilidade de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake – Leguminosae Caesalpinoideae, pelos testes de germinação e tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*. 2007. vol. 29, nº 3, p.83-89,

FLORIANO, Eduardo Pagel. Germinação e dormência de sementes florestais. *Caderno Didático* nº 2, 1^a ed. Santa Rosa, 2004. 19 p.

FOGAÇA, Cristiane Alves; MALAVASI, Marlene de Matos; ZUCARELI Claudemir; MALAVASI, Ubirajara Contro. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Caesalpinaeae. *Revista Brasileira de Sementes*. 2006. vol. 28, nº 3, p.101-107,

FRANÇA, Suzelei de Castro. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento / organizado por SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELOO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. 2004. 5^a Ed Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC,

FUMAGALI, Elisângela; GONÇALVES, Regina Aparecida Correia; MACHADO, Maria de Fátima Pires Silva; VIDOTI, Gentil José; OLIVEIRA, Arildo José Braz de. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008. 18(4): 627-641, Out./Dez.

GAGLIARDI, Rachel Fatima Gagliardi; HANAI, Luiz Ricardo; PACHECO, Geórgia; OLIVEIRA, Carlos Alberto; CARNEIRO, Leonardo Alves; VALLS, José Francisco Montenegro; MANSUR, Elisabeth; VIEIRA, Maria Lucia Carneiro. Assessment of Genetic Stability Among In Vitro Plants of *Arachis retusa* Using RAPD and AFLP Markers for Germplasm Preservation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007. 49 (3): 307–312.

GALERA, Sonia Gómez; PELACHO, Ana M.; GENÉ, Anna; CAPELL, Teresa; CHRISTOU, Paul. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Report*. 2007. 26:1689-1715.

GATTAPAGLIA, Dario; FERREIRA, Márcio Elias Ferreira. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP. MAARA. 1995. Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN.

GATTAPAGLIA, Dario; MACHADO, Marcos A. Machado. Micropropagação. In: *Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas*. Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília. 1998. Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.

GEORGIEV, Milen I.; PAVILOV, Atanas I.; BLEY, Thomas. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007. 74:1175–1185.

GUERRA, Miguel Pedro; NODARI, Rubens Onofre. Apostila de Biotecnologia 1 - Cultura de Tecidos Vegetal. Material de Apoio - 8^a Fase do Curso de Agronomia - 2006. CCA/UFSC, Florianópolis. Edição Steinmacher.

GUERRA, Miguel Pedro; NODARI, Rubens Onofre. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento / organizado por SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELOO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros*. 2004. 5^a Ed Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC.

GUERRA, Miguel Pedro; TORRES, Antonio Carlos; TEIXEIRA, João Batista. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: *Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas*. 1998. Vol 2. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.,

GUILLON, S; TREMOUILLAUX-GUILLER, J; PATI, PK; RIDEAU, M; GANTET, P. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. 2006. *Curr Opin Plant Biol* 9:341–346.

GUO, W. L.; WU, E. R.; ZHANG, Y. F.; LIU, X. M.; WANG, H. Y.; GONG, L.; ZHANG, Z. H.; LIU, Bao. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. F. *Plant Cell Report*. 2007. 26:1297-1307.

HANDRO, Walter e FLOCH, Eny I. S. Aspectos Básicos do Controle da Morfogênese "in vitro" In: TORRES, Antonio Carlos e CALDAS, Linda Styer. Técnicas e aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. ABCTP. EMBRAPA-CNPH. Brasília. 1990. p. 203-211.

HONG, Hai Ping; ZHANG, Hongyi; OLHOFT, Paula Olhoft; HILL, Steve; WILEY, Hunt; TOREN, Effie; HILLEBRAND, Helke; JONES, Todd; CHENG, Ming. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via Agrobacterium in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*. 2007. 43:558-568.

HUANG, Li-Chun; CHIU, Dor-Shen; MURASHIGE, Toshio; GUNDY, Richard Van; MAHDI, El Fatih M.; NAGAI, Kazuo; PLIEGO-ALFARRO, Fernando. Rejuvenation of Trees and Other Perennials for Restoration of Plant Regeneration Competence. In: TORRES, Antonio Carlos e CALDAS, Linda Styer. Técnicas e aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. ABCTP. EMBRAPA-CNPH. Brasília. 1990. p. 251-268.

IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 29/01/2009.

JIMÉNEZ, Vitor M. Regulation of in vitro somatic aembryoigenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. 2001. 13(2):196-223,

JOSÉ, Anderson Cleiton; SILVA, Edvaldo Amaral; DAVIDE, Antonio Claudio. Classificação fisiológica de sementes de cinco espécies arbóreas de mata ciliar quanto a tolerância à dessecação e ao armazenamento. Revista Brasileira de Sementes. 2007. vol. 29, nº 2, p.171-178.

KERBAUY, Gilberto Barbante. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. 1999. Vol. 2. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH,

KERBAUY, Gilberto Barbante. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas.. 1998. Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH,

KISS, J; KONDRÁK, M; TÖRJÉK, O; KISS, E; GYULAI, G; MÁZIK-TÖKEI, K.; HESZKY, L.E. Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. Euphytica. 2001. 118: 213-221,

KLINK, Vincent P.; MacDONALD, Margaret H.; MARTINS, Veronica E. Martins; PARK, Soo-Chul Park; KIM, Kyung-Hwan; BAEK, So-Hyeon Baek; MATTHEWS, Benjamin F. MiniMax, a new diminutive *Glycine max* genotype with a rapid life cycle, embryogenic potential and transformation capabilities. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2008. 92:183-195.

LIMA, Haroldo C. de; PEIXOTO, Ariane Luna; PEREIRA, Tânia Sampaio. Conservação da flora da Mata Atlântica. In: Lana da Silva Sylvestre e Maria Mercedes Teixeira da Rosa. Manual metodológico para estudos botânicos na Mata Atlântica. 1^a ed. Seropédica, RJ: EDUR. 2002. p.104-121.

LIU, Chun-Zhao Liu; GAO, Min; GUO, Bin. Plant regeneration of *Erigeron breviscapus* (vant.) Hand. Mazz. and its chromatographic fingerprint analysis for quality control. Plant Cell Repot. 2008. 27:39-45.

MACHADO, Maria de Fátima Pires da Silva; COLLET, Sandra Aparecida de Oliveira; MANGOLIN, Claudete Aparecida. Expressão gênica no desenvolvimento de tecidos vegetais *in vitro*. Maringá. 1998. EDUEM.

MARCONDES, Maria Celeste; ANDREOLI, Claudinei; MIGLIORANZA, Edison. Equação de viabilidade para determinar a longevidade de sementes de trigo sob condições diferenciadas em armazenamento convencional. 2007. Revista Brasileira de Sementes, vol. 29, nº 3, p. 202-207.

MARTINS, Cibele Chalita; MARTINELLI-SENEME, Adriana; CASTRO, Marcia Maria; NAKAGAWA, João; CAVARIANI, Cláudio. Comparação entre métodos para a avaliação do vigor de lotes de sementes de couve-brócolos (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenk). 2002. Revista Brasileira de Sementes, vol. 24, nº 2, p.96-101.

MARTINS, Leila; LAGO, Antonio Augusto do. Conservação de semente de *Cedrela fissilis* teor de água da semente e temperatura do ambiente. Revista Brasileira de Sementes. 2008. vol. 30, nº 1, p.161-167.

MELCHIOR, Saulo José; CUSTÓDIO, Ceci Castilho; MARQUES, Tadeu Alcides; NETO, Nelson Barbosa Machado. Colheita e armazenamento de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. Revista Brasileira de Sementes. 2006. vol. 28, nº 3, p.141-150.

MERKLE, Scott A; NAIRN C. Joseph. Hardwood Tree Biotechnology. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2005. 41:602-619, September-October.

MISAWA, Masanaru. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite. Bio International Inc. Toronto, Canada. FAO AGRICULTURAL SERVICES BULLETIN. 1994.. No. 108. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.

NOLETO, Leonardo Gonçalves e SILVEIRA, Conceição Eneida dos Santos. Micropropagação de copaíba. Propagação in vitro de *Copaifera langsdorffii* Desf. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Edição 33, jul-dez 2004. p. 109-120.

OH, Thomas J., CULLIS, Margaret A., KUNERT, Karl, ENGELBORGHHS, Iris, SWENNEN, Rony, CULLIS Christopher A. Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). 2007. *Physiologia Plantarum*. 129: 766-774.

OLIVEIRA, Rodrigo L. C. de; NETO, Ernani M. F. Lins; ARAÚJO, Elcida L.; ALBUQUERQUE, Ulysses P. Conservation Priorities and Population Structure of Woody Medicinal Plants in an Area of Caatinga Vegetation (Pernambuco State, NE Brazil). *Environ Monit Assess*. 2007. 132:189-206.

PALOMBI, Maria Antonietta; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Report* .2002. 20:1061-1066.

PALOMBI, Maria Antonietta; LOMBARDO, Beatrice; CARBONI, Emilia. In vitro regeneration of wild pear (*Pyrus pyraster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. *Plant Cell Rep*. 2007. 26:489-496.

PAZ, Oswaldo Pereira da; PASQUAL, Moacir. Microenxertia. In: *Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas..* Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer

Caldas; José Amauri Buso. 1998. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.

PIJUT, Paula M., WOESTE, Keith; VENGADESAN, G.; MICHLER, Charles H. Technological advances in temperate hardwood tree improvement including breeding and molecular marker applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2007. 43:283-303.

PINTO, Tais L. F.; BRANCALION, Pedro H. S.; NOVEMBRE, Ana D. L. C.; CICERO, Silvio M. Avaliação da viabilidade de sementes de coração-de-negro (*Poecilanthe parviflora* Benth. - Fabaceae-Faboideae) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes.* 2008. vol. 30, nº 1, p.208-214.

PONTAROLI, Ana Clara e CAMADRO, Elsa Lucila. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genetics and Molecular Biology.* 2005. 28, 3, 423-430.

RAVEN, Peter H.; EVERET, Ray F.; EICHHORN, Susan E. *Biologia Vegetal.* 2007. 2005. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

SALEM, Halima Hassan, ALIL, Bahy Ahmed, HUANG, Tian-Hua , QIN, Da-Nian, WANG, Xiao-Mei, XIE, Qing-Dong. Use of Random Amplified Polymorphic DNA. Analysis for Economically Important Food Crops. Invited Review. *Journal of Integrative Plant Biology.* 2007, 49 (12): 1670-1680.

SANTANA, Maria de Fátima Ebole de. O perfil da biotecnologia no Brasil: investimentos, recursos humanos e a indústria de biotecnologia. 2004. Tese (Mestrado em ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Tecnologia Escola de Química.

SANTANA, Maria de Fátima Ebole; PEREIRA Jr, Nei; ANTUNES, Adelaide Maria de Souza. O Perfil da Biotecnologia no Brasil: Investimentos, Recursos Humanos e a Indústria de Biotecnologia. 2005. Edição preliminar. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SANTOS, Izulmê R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.* 2000. 12 (Edição Especial):70-84,

SANTOS, Rosana Isabel dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento / organizado por SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELOO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. 2004. 5^a Ed Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC.

SARASAN, Viswambharan; CRIPPS, Ryan; RAMSAY, Margaret M.; ATHERTON, Caroline; McMICHEN, Monica PRENDERGAST, Grace; ROWNTREE, Jennifer K. Conservation in vitro of threatened plants - progress in the past decade. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2006. 42:206-214, May-June

SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; PETROVICK, Pedro Ros. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento / organizado por SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. 2004.. 5^a Ed Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC

SIMÕES, Claudia. Estudos biotecnológicos e avaliação do potencial farmacológico de *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae). 2009. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal. 86 p. Il.

SOUZA, Antônio da Silva e JUNGHANS, Tatiana Góes. Editores. Introdução à micropropagação de Plantas. Cruz das Almas; Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

SOUZA, Antônio da Silva; COSTA, Maria Angélica Pereira de Carvalho; SANTOS-SEREJO, Janey Almeida dos, JUNGHANS, Tatiana Góes; SOUZA, Fernanda Vidigal Duarte. Introdução à Cultura de Tecidos de Plantas. in: SOUZA, Antônio da Silva e JUNGHANS, Tatiana Góes. Editores. Introdução à micropropagação de Plantas. Cruz das Almas; Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

TEIXEIRA, Everton Felix; CICERO, Silvio Moure; NETO, Durval Dourado. Análise de imagens digitais de plântulas para avaliação do vigor de sementes de milho. Revista Brasileira de Sementes. 2006. vol. 28, nº 2, p.159-167.

TORRES, Antonio Carlos Torres; CALDAS, Linda Styer; FERREIRA, Adriana Teixeira. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. 1998. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.

TORRES, Antonio Carlos; GUERRA, Miguel Pedro; FERREIRA, Adriana Teixeira. Cultura de ovários. 1998. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.

TORRES, Antonio Carlos; NISHIJIMA, Marta Luriko; CATTONY, Mônica Kangussú. Polinização e Fertilização "in vitro". In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. , 1998. Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.

TORRES, Antonio Carlos; TEIXEIRA, Sílvio Lopes; POZZER, Luciana. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. 1998.Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.

VALLEDOR, Luis; HASBÚN, Rodrigo; MEIJÓN, Mónica; RODRÍGUEZ, Jose Luis; SANTAMARÍA, Estrella; VIEJO, Marcos; BERDASCO, Maria; FEITO, Isabel; FRAGA, Mario F.; CAÑAL, Maria Jesus; RODRÍGUEZ, Roberto. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2007) 91:75–86.

VALOIS, Celso Candeira; SALOMÃO, Antonieta Nassif; ALLEM, Antonio Costa. (orgs). Glossário de Recursos Genéticos Vegetais. Brasília : Embrapa SPI. 1996. 62p.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. In Vitro Cellular Development.Biology — Plant. 2007. 43:267–274.

VIANA, Vera Regina Campos; ALVES, Helio M.; SIMÕES, Cláudia; FIGUEIREDO, Solange Faria Lua. Produção de 4-Nerolidilcatecol em suspensões celulares de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq (Piperaceae). Rev Cubana Plant Med. 2004. v.9 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr.

VIDIGAL, Débora de Souza; Lima, Júlien da Silva; BHERING, Maria Carmen; DIAS, Denise Cunha F. Santos. Teste de condutividade elétrica para semente de pimenta. Revista Brasileira de Sementes. 2008. vol. 30, nº 1, p.168-174.

WENDT, Simone Neumann, SOUZA, Valderêz Aparecida de, QUOIRIN, Marguerite, SEBBENN, Alexandre Magno, MAZZA, Maria Cristina, STURION, José Alfredo. Caracterização genética de procedências e progêneres de *Ilex paraguariensis* St. Hil. utilizando marcadores RAPD. Scientia Forestalis, 2007. n. 73, p. 47-53, março.

WITHERS, Lyndsey A.; WILLIAMS, J. T. Conservação "in vitro" de recursos genéticos de plantas. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. 1998. Vol. I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.

YANG, Xuexi; CHEN, Hui; XU, Wenzhong; HE, Zhenyan; MA, Mi. Hyperaccumulation of arsenic by callus, sporophytes and gametophytes of *Pteris vittata* cultured in vitro. Plant Cell Report. 2007. 26:1889-1897.

CAPITULO I

INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CALOGÊNESE *in vitro* DE *Caesalpinia echinata* Lam.

3.1 - Resumo

A *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) é uma árvore nativa que consta da lista de espécies ameaçadas no país (BRASIL, 2008) e potencial fonte de substâncias químicas de interesse farmacológico/terapêutico, tal como as proteínas descritas por Silva (2006). Este trabalho objetivou estudar a indução e manutenção *in vitro* de cultura celular da espécie, a partir de diferentes explantes iniciais. Entre as dificuldades encontradas na cultura *in vitro* de espécies arbóreas, estão as condições fisiológicas dos explantes oriundos de plantas adultas. Foi possível induzir e manter calos com morfologia diversificada, a partir de diferentes explantes em estádios distintos de desenvolvimento, entre os quais, o pistilo, a semente, o embrião e o tegumento. A calogênese foi induzida e mantida principalmente com a combinação equimolar de 9,04 μ M de 2,4-D e de BAP, em meio de cultura MS (Murashige, Skoog, 1962) com metade da concentração salina, complementado com 100mg.L⁻¹ de mio-inositol, 6g.L⁻¹ de agar, 3% de sacarose e pH ajustado para 5,7 antes da autoclave. O uso de explantes em estádios iniciais de desenvolvimento reduziu significativamente o índice de contaminação e incrementou as taxas de calogênese. Os calos formados a partir do tegumento, usado como explante, podem ter se originado do complexo estomático existente neste tecido, ou de células residuais do endosperma. Foi possível induzir e manter calos viáveis, por longo período a partir de explantes contendo: o genótipo da planta matriz; o genoma resultante da fecundação da oosfera e; possivelmente, o balanço genômico 2m:1p, resultado da dupla fecundação que origina o endosperma.

Palavras-chave: plantas lenhosas; cultura de tecidos vegetais; cultura celular.

3.2 - Abstract

The *Caesalpinia echinata* Lam (Brazil wood) is a native tree that is listed as a threatened species in Brazil (BRASIL, 2008) and potential source of chemicals of interest pharmacological/therapeutic proteins as described by Silva (2006). This study investigated the induction and maintenance in vitro cell culture of the species, from different explants. Among the difficulties encountered in in vitro cultures of tree species, are the physiological conditions of explants from adult plants. It was possible to induce and maintain callus with diverse morphology, from different explants in different stages of development, including the pistil, seed, embryo and integument. Callus formation was induced and maintained mainly by combining equimolar 9.04 mM 2,4-D and BAP in MS medium (Murashige e Skoog, 1962) with half the salt concentration, supplemented with 100mg.L⁻¹ myo-inositol, 6g.L⁻¹ agar, 3% sucrose and pH adjusted to 5.7 before autoclaving. The use of explants in the early stages significantly reduced infection rates and increased rates of callus formation. The calli formed from the tegument, used as explant, may have originated from stomatal existing in this tissue, or residual cells of the endosperm. It was possible to induce callus and maintain viable for a long period from explants contained the genotype of the stock plant, the genome resulting from fertilization of the egg cell and, possibly, the balance genomic 2m: 1p, a result of double fertilization which gives rise to the endosperm.

Keywords: woody plants, plant tissue culture, cell culture.

3.3 - Introdução

A *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) é uma espécie lenhosa da família das leguminosas, originária da Floresta Atlântica, que se encontra sob ameaça de extinção (Brasil, 2008). Esta condição se deve não só à redução física de seu bioma, mas também ao pouco conhecimento sobre sua propagação (Barbedo, 2002). Existem relatos de êxito na aplicação de cultura de tecidos para espécies lenhosas de clima temperado utilizando sementes e plântulas como explantes, pois, tecidos com alta juvenilidade, facilitam os estudos necessários ao desenvolvimento de sistemas de propagação para árvores maduras (Pijut *et al*, 2007). Atualmente, são considerados dois padrões morfogenéticos que ocorrem *in vitro*: 1) morfogênese direta, quando os órgãos ou embriões se originam diretamente do explante, sem formação de calos (massa de células não diferenciadas, de proliferação desordenada e 2) morfogênese indireta, quando há prévia formação de calo antes do desenvolvimento de estruturas organizadas (Costa, Souza, Almeida, 2006). Calos podem ser interessantes para produção em massa de embriões somáticos, são um importante material para diversos métodos de transformação de plantas, incluindo os mediados por *Agrobacterium tumefaciens* e o biológico (Yang *et al*, 2007) e também servem para obtenção de suspensão celular em meio líquido, que é condição mais adequada para explorações biotecnológicas (França, 2004).

Chu *et al* (2003) relata a produção de pequenos calos a partir de diferentes explantes vegetativos (fragmentos foliares, gemas axilares e fragmentos de plântulas) em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) em concentrações de 4,0 mg.L⁻¹ de diferentes auxinas (2,4-D, ANA e picloram), entretanto oxidaram-se rapidamente mesmo mantendo as culturas em ausência de luz e na presença de misturas de antioxidantes (cisteína, ácido cítrico, PVP, carvão ativado e tiosulfato de sódio). Werner *et al* (2007) obteve calogênese em foliolos juvenis utilizando concentrações de 5 a 20 mg.L⁻¹ de 2,4-D, sendo esta concentração elevada para 50 a 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D para obter respostas semelhantes em foliolos em estádio de desenvolvimento mais avançado. Pessotti *et al* (2007) utilizou o mesmo protocolo e submeteu os calos formados a tratamentos com diferentes combinações de 2,4-D e BAP, obtendo diversidade morfológica de calos e identificando estruturas globulares pró-embriônicas (PEM) em porções friáveis, translúcidas e verdes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes estratégias para obtenção de explantes competentes para calogênese *in vitro* e identificar condições adequadas para a manutenção da cultura de células da espécie por longos períodos sem a perda de capacidade de proliferação. Explantes de *Caesalpinia echinata* Lam. compostos por diferentes tipos de tecidos, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram excisados de matrizes adultas e plântulas germinadas *in vitro* e *ex vitro*. Os resultados apontam a possibilidade da cultura *in vitro* de células da espécie servir para estudos sobre síntese de compostos de interesse além do seu potencial uso como alternativa complementar à conservação *in situ* espécie, que por ser rara e ameaçada de extinção, justifica, e mesmo enseja tal complementaridade, que nestes casos, é considerada essencial por Giudice-Neto, Sebbenn, Kageyama (2005).

3.4 - Material e Métodos

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) nos anos de 2006 a 2009. Os explantes foram obtidos de um total de 07 (sete) plantas matrizes adultas, localizadas no campus da UFRRJ (22°45' Sul e 43°41' Oeste).

3.4.1 -Limpeza superficial dos explantes, manipulação asséptica e meio de cultura.

Os experimentos foram precedidos de ensaios para determinação do melhor tratamento de limpeza superficial para cada tipo de explante. Inicialmente adotou-se protocolo com lavagem em solução de água destilada e detergente neutro, seguida de imersão em etanol 70% por 1 minuto, posteriormente em diluições de água sanitária comercial (de 10 a 50%), e por fim imersões sucessivas em água destilada e autoclavada. Testes iniciais demonstraram que o uso do produto comercial “Clor-inTM⁶” (Dicloro-S-Triazinetone de Sódio) em substituição a água sanitária (NaClO) em concentrações variando de 2 a 5% de equivalência a cloro ativo, foram eficientes para limpeza da maioria dos explantes utilizados nos experimentos e promoveram menor índice de “branqueamento” e outros danos que provocam a necrose e morte dos tecidos dos explantes. O protocolo de limpeza adotado na maioria dos experimentos inicia-se com a imersão dos explantes em água estéril com cerca de 1% (v/v) de detergente neutro, sob agitação, por cerca de 40 minutos. Após este período os explantes foram submersos por 20 minutos, sob agitação moderada, em solução aquosa com 72mg.L⁻¹ de dicloro-S-Triazinetone de Sódio (Clor-in), que promove a liberação de ácido hipocloroso, em concentração equivalente a 4% de cloro ativo (dados do fabricante). Foram feitas pequenas variações no protocolo de limpeza superficial em alguns experimentos, conforme explicitados na descrição dos mesmos. Toda a manipulação, após procedimentos iniciais de limpeza superficial dos explantes, foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal, previamente limpa com etanol 70% e submetida à radiação ultravioleta por no mínimo 30 minutos antes do inicio dos trabalhos.

Foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da concentração salina, complementado com mio-inositol (100mg.L⁻¹) e 3% de sacarose. Com exceção do ensaio preliminar que se utilizou de soluções estoque preparadas conforme descrito em Caldas *et al* (1998), nos demais experimentos, de modo a agilizar o preparo do meio de cultura, se utilizou a formulação comercial (Phytotechnology Lab. produto M519 lote 06B51919C), observando-se a complementação adequada de mio-inositol, de modo que a concentração final fosse de 100mg.L⁻¹. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 previamente a esterilização em autoclave. Foram utilizados diferentes recipientes de acordo com o tipo de experimento. Em tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro e 10 cm de altura foram vertidos 8 ± 1 mL. Em placas de petri foram utilizados cerca de 30m, e em potes de cultura foram utilizados cerca de 50mL. A consistência do meio de cultura variou de líquida (sem adição de agar) e sólida (6 a 10g.L⁻¹ de agar). No caso dos experimentos avaliando a germinação foram utilizados diferentes substratos (vermiculita, meio de cultura, papel de germinação) em diferentes recipientes (caixas, gerbox, tubos de ensaio). Os explantes estabelecidos *in vitro* foi mantidos em ausência de luz, em temperatura de 25 ± 1°C por todo o período avaliado.

⁶Acuapura Indústria e Comércio.

3.4.2-Delineamento experimental e avaliações.

O delineamento experimental adotado variou conforme o experimento realizado. A avaliação das condições iniciais para a indução de calogênese foi feita em delineamento inteiramente casualizado com 2 repetições de 6 sementes por parcela sub-dividida, em arranjo fatorial (2x2x4), cujos fatores foram, dois tipos de auxina (2,4-D e ANA) nas concentrações de 4,5 μ M e 5,4 μ M respectivamente, combinadas, com duas concentrações de BAP (4,4 μ M e 8,9 μ M), adotando-se como subdivisão da parcela, quatro diferentes posições de inserção da semente no meio de cultura (Figura 2).

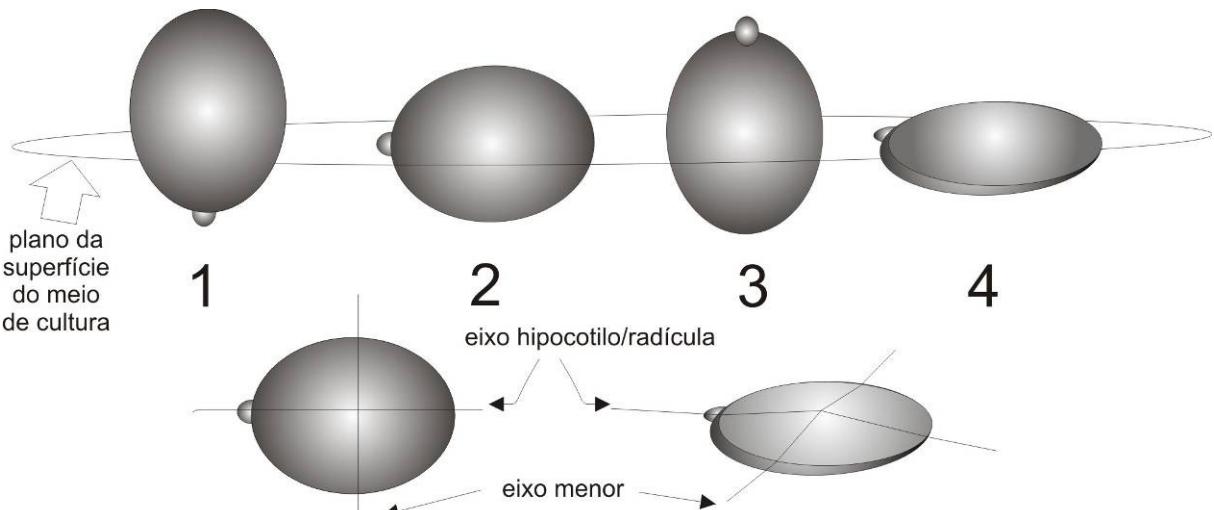


Figura 2 – Ilustração das formas testadas de inserção das sementes no meio de cultura.

A coleta de sementes aos 15, 21, 28 e 35 dias após a antese das flores (DAF), foi avaliada em ensaio em blocos por data de coleta, com 4 repetições de 10 sementes, em meio de cultura contendo 9,04 μ M de 2,4-D e de BAP. O pistilo foi avaliado como explante inicial da cultura em meio de cultura com a mesma combinação de 2,4-D e de BAP, através de delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições de 10 explantes, coletados antes e após a antese da flores, na mesma data. Combinação idêntica de reguladores de crescimento e o mesmo delineamento estatístico foram adotados para avaliar a calogênese no tegumento em comparação com a semente nua, sem tegumento. No período entre 3 e 4 meses da cultura inicial, os calos produzidos a partir do tegumento foram subdivididos e transferidos para meio isento de reguladores de crescimento ou contendo a combinação de 9,04 μ M de 2,4-D e de BAP, em 4 blocos definidos pela data da subcultura. Ensaios para a indução de calogênese a partir de anteras, plântulas inteiras e fragmentos destas (folíolo, epicótilo, nó cotiledonar, epicótilo e hipocótilo), também foram implantados. Nos ensaios preliminares com sementes e embriões, foi calculado o índice de velocidade de germinação baseado na fórmula proposta por Maguire (1962), conforme descrito em Santana e Ranal (2004), para comparação entre os tratamentos estudados e o teste padrão de germinação em rolo de papel. Foram calculados os índices de contaminação, calogênese e viabilidade ao longo do tempo de cultura, computada pela constatação visual do surgimento de novas células na massa de calos. Todos os dados foram transformados pela fórmula $X_t = RAIZ (X + X_{máx})$, onde $X_{máx}$ é o maior valor aferido para cada parâmetro analisado, conforme descrito em Nenartavis *et al* (2004). Os

dados transformados foram submetidos à ANOVA aplicando-se o teste F e, quando pertinente, realizou-se a comparação de médias pelo teste de Duncan ($p<5\%$).

Com o objetivo de avaliar condições para a germinação *in vitro* de sementes maduras armazenadas por mais de 18 meses foram classificadas quanto à data de coleta, dimensões, coloração, massa fresca e conteúdo de água e após diferentes períodos de armazenamento foram submetidas ao teste do tetrazólio correlacionando-o ao teste padrão de germinação (Brasil, 1992). A avaliação da viabilidade de sementes testou três concentrações da solução de tetrazólio, 0,075; 0,15 e 0,3% utilizando-se três repetições de 20 sementes, que foram amostradas ao longo das 6 horas que ficaram submersas na solução de tetrazólio em temperatura de 35°C +ou- 2°C, após o período de embebição em rolo de papel contendo quantidade (mL) de água 2,5 vezes sua massa (g) (Brasil, 1992). As sementes maduras, após limpeza superficial foram submetidas ao teste padrão de germinação em rolo de papel (Brasil, 1992). Para germinação *in vitro*, as sementes foram dispostas em tubos de ensaio sobre suporte feito com o mesmo papel da germinação, contendo água também em quantidade 2,5 vezes superior a sua massa, previamente autoclavados à 120°C por 20 min. A limpeza superficial foi feita pela imersão das sementes em água estéril sob agitação contínua, com detergente neutro 0,1% (v/v) por 20 minutos, depois em etanol 70% (v/v) por 5 minutos e posteriormente em hipoclorito de sódio 3%, por 20 minutos. Após este tratamento, as sementes foram banhadas três vezes seguidas em água destilada e autoclavada (estéril), na câmara de fluxo laminar horizontal. Em metade das sementes, que foram divididas em categorias conforme descrito acima se removeu o tegumento antes de submetê-las as diferentes condições de germinação estudadas: sobre ponte de papel acondicionado em tubo de ensaio ou entre papel, formando rolos, conforme teste padrão de germinação. Foram testadas também a germinação em areia, em vermiculita, e entre papel disposto em “gerbox”. Foram utilizadas 5 repetições de 20 sementes por tratamento. Em síntese, foram avaliados nos diferentes experimentos: a posição de inserção da semente no meio de cultura (4 posições diferentes); diferentes estádios de desenvolvimento do fruto indeiscente (4 estádios); o armazenamento destas sementes por curtos períodos simulando transporte de regiões de coleta distantes do laboratório; a cultura do embrião isoladamente das demais partes das sementes e a remoção do tegumento, testados em diferentes substratos para a cultura (ponte de papel e meio de cultura). Quando pertinente calculou-se o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) a partir da adaptação da fórmula apresentada por Maguire (1962 *apud* Santana e Ranal, 2004), onde $IVG = \sum(n^o \text{ de sementes germinadas/dias até a contagem})$.

Diferentes tipos de explantes obtidos de plântulas oriundas da germinação de sementes nos experimentos anteriores foram submetidos a diferentes balanços de 2,4-D ou ANA (4,52 e 9,04 μM) combinados com BAP ou KIN (4,52 e 9,04 μM). As plântulas germinadas nos tubos de ensaio forneceram explantes de vários tipos: embrião inteiro, embrião com somente um dos cotilédones, porção distal do hipocôtilo, porção proximal, epicôtilo, nó cotiledonar, cotilédones isolados, radícula, gemas apicais e folíolos. Os explantes foram introduzidos em meio de cultura MS com metade da concentração de sais minerais, 3% de sacarose, 0,6% de ágar, os balanços de reguladores descritos e pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. O meio foi vertido em placas de petri de 10 e 15 cm de diâmetro ou tubos de ensaio. Foram utilizados somente explantes de plântulas sem indícios visíveis da presença de contaminantes.

Experimento com embriões excisados de sementes armazenadas à 4° C, por período superior a 24 meses, foi implantado com o objetivo de avaliar a calogênese e germinação como estratégia para recuperação de acessos armazenados por longo período. Foi utilizado o delineamento estatístico em blocos ao acaso testando-se três diferentes meios para a germinação em tubo de ensaio dos embriões após tratamento de limpeza superficial com água

estéril com cerca de 1% (v/v) de detergente neutro, sob agitação, por cerca de 40 minutos, seguido de imersão em etanol 70% por cerca de 1 minuto e posteriormente 20 minutos em solução aquosa com 72mg.L^{-1} de dicloro-S-Tiazinetone de Sódio (Clor-in), seguido de mesmo tempo de tratamento e nova solução de Clor-in de mesma concentração, que equivale a cerca de 4% de cloro ativo. Foram utilizadas três repetições de três embriões por tratamento. Os meios de cultura testados, todos com 0,7% de agar, foram: 1- meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da concentração salina, complementado com mio-inositol (100mg.L^{-1}) e 6% de sacarose; 2- meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da concentração salina, complementado com mio-inositol (100mg.L^{-1}), 6% de sacarose e $9,04\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D e 3-solução com 6% de sacarose.

3.5 - Resultados e discussão.

A embebição de sementes de pau-brasil foi acompanhada durante cerca de 30 horas com medições periódicas. A curva que indica a evolução do incremento de massa fresca nas sementes apresentou formato sigmoidal onde podem ser observadas as três fases características da germinação. Os dados foram corroborados pelos primeiros sinais de protusão da radícula no início da terceira fase (após cerca de 24 horas), confirmando-se o período de 18 horas como suficiente para a aplicação do teste de tetrazólio (Figura 3).

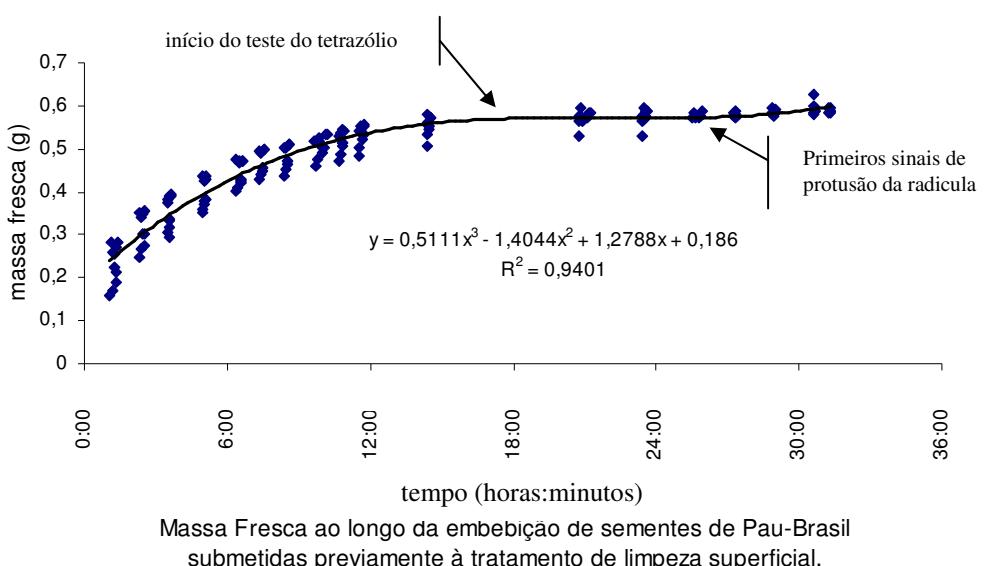


Figura 3 - Massa fresca de sementes maduras de *Caesalpinia echinata* Lam ao longo da embebição em rolo de papel contendo água estéril em quantidade (mL) 2,5 vezes a massa do papel (g).

A partir do acompanhamento de incremento da massa fresca durante a embebição foi possível confirmar que o período de 18 horas foi suficiente para o inicio da atividade enzimática na germinação, necessária para aplicação do teste do tetrazólio. Não foi possível estabelecer uma correlação entre o vigor e viabilidade no teste de germinação com a avaliação pelo teste do tetrazólio em decorrência da quantidade insuficiente de sementes e repetições utilizadas, inferiores às necessárias para este objetivo. Entretanto confirmou-se que a solução de tetrazólio em concentração de 0,075% aplicada a sementes por cerca de 3 a 4 horas a $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, é suficiente para promover a coloração adequada dos tecidos, desde que o tegumento seja

removido anteriormente à imersão em tetrazólio. Para sementes com tegumento, verificou-se que o tempo do tratamento, ou a concentração da solução de tetrazólio, deve ser maior, visto que o tegumento impõe restrições à difusão da substância até os cotilédones e o embrião. Nestes casos a coloração, até 4 horas de tratamento, ficou restrita à porções das semente que ficaram expostas à solução em função do rompimento do tegumento promovido pela aumento de volume da semente após embebição. Tecidos mortos não foram coloridos ou apresentaram-se acinzentados, e tecidos em deterioração apresentaram coloração carmim e marrom, ambas bastante escurecidas. Tecidos de sementes imaturas também não são corados, possivelmente em decorrência da baixa permeabilidade das membranas ao sal de tetrazólio (Figura 4).

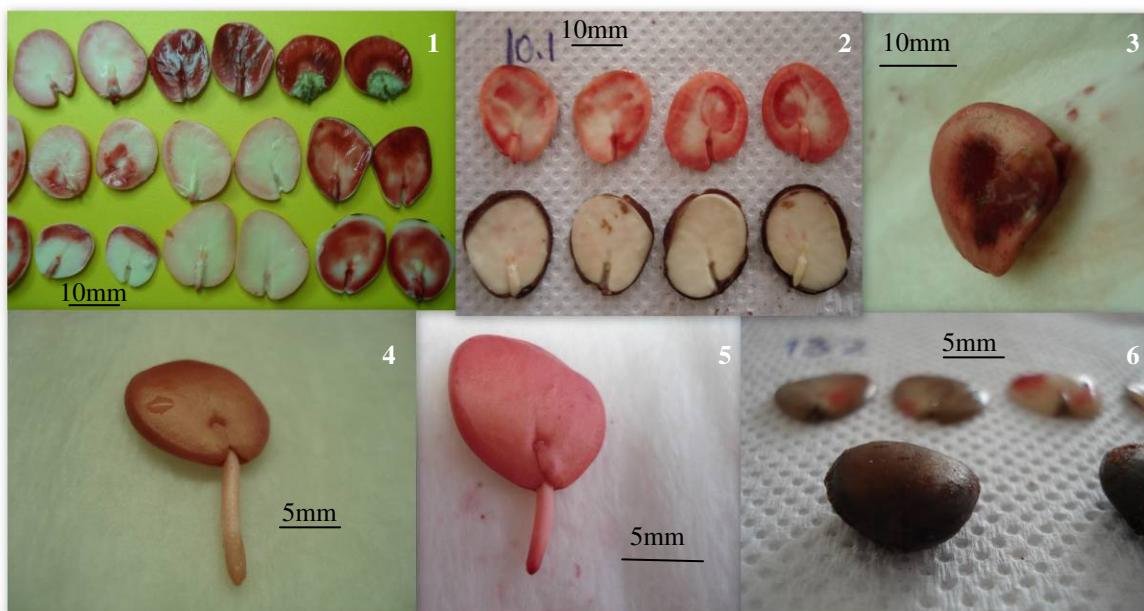


Figura 4 - Coloração das sementes de *Caesalpinia echinta* Lam. pelo teste de tetrazólio após 3h em solução de 0,075%: 1) sementes apresentando diferentes intensidades de deterioração e de permeabilidade ao sal de tetrazólio; 2) diferenças na coloração de sementes submetidas ao sal de tetrazólio sem tegumento (acima) e com tegumento (abaixo); 3) coloração denotando deterioração dos tecidos; 4) e 5) coloração observada em sementes viáveis; 6) ao fundo, coloração de tecidos mortos e em primeiro plano o “inchaço” provocado pela proliferação de microorganismos (provavelmente leveduras) que pode ser usado como indicador de inviabilidade de sementes após 15 horas de embebição.

O vigor das sementes maduras armazenadas, avaliado através do cálculo do IVG resultou em valores, para as condições *in vitro*, inferiores ao teste padrão de germinação. Quanto maior o valor do IVG maior é o vigor da amostra e pode-se afirmar que o resultado final significa o número de sementes germinadas por dia (Santana e Ranal, 2004). O resultado demonstra que a germinação nas condições *in vitro* apresenta menor vigor quando comparada com o teste padrão de germinação (Tabela 7).

Tabela 7 - Germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. aferida aos 35 dias após terem sido submetidas a diferentes condições *in* e *ex* *vitro*.

Condições	germinação %	IVG
Sobre papel em tubo de ensaio	38,7	1,72
Entre papel (rolo de papel)	42,7	3,28

Os resultados permitem concluir que a germinação em tubo de ensaio sobre suporte de papel mostra-se uma alternativa de baixo custo para obtenção de plântulas *in vitro*, que podem ser utilizadas para procedimentos de enxertia *in vitro* e como matrizes fornecedoras de explantes juvenis, livres de contaminação. Entretanto é necessário aperfeiçoar as técnicas de limpeza superficial visto que apesar de menor intensidade que em outras condições estudadas, o índice de contaminação na germinação em tubo de ensaio sobre ponte de papel ainda apresentou-se como fator limitante ao uso desta estratégia (Figura 5).

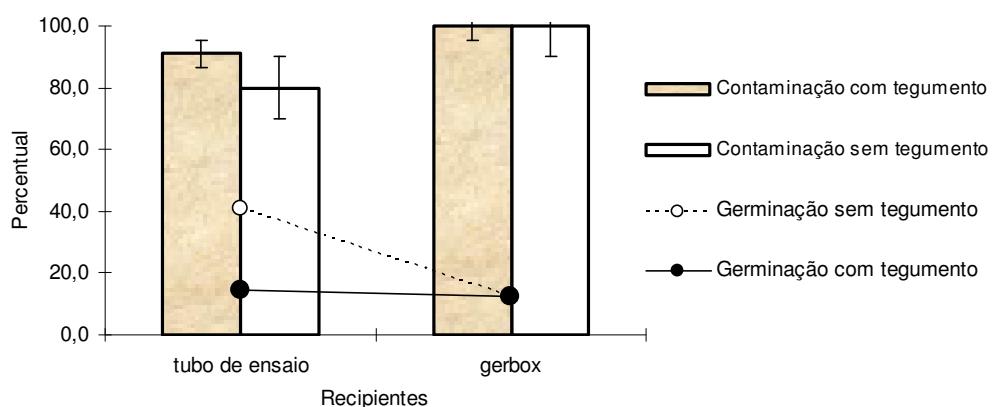


Figura 5 - Contaminação e germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam maduras, sobre papel em diferentes recipientes.

O uso de sementes colhidas de frutos ainda indeiscentes mostrou-se como estratégia eficaz para obtenção e manutenção de plântulas em ambiente asséptico. O índice de contaminação foi maior em sementes colhidas de frutos em estádios de maturação mais avançados, mesmo antes da deiscência destes (Tabela 8).

Tabela 8- Contaminação em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam, dispostas em tubos de ensaio com meio de cultura com diferentes estádios de desenvolvimento: 1=15, 2=21, 3=28 e 4=35 dias após a antese das flores (DAF), independentemente do balanço de reguladores de crescimento.

Estádio de desenvolvimento (DAF*)	Contaminação
15	0,0
21	3,3
28	10,8
35	92,5

*DAF= dias após a antese das flores

A germinação normal apresenta indícios da influência tanto da posição de inserção no meio de cultura quanto pela presença de reguladores de crescimento (Figura 6), entretanto a análise estatística dos resultados não acusou diferença significativa entre os tratamentos, possivelmente devido ao delineamento adotado, que reduziu a acurácia da análise. Foi observada a ocorrência de geotropismo negativo e deformações diversas na morfologia do epicótilo e radícula. As anormalidades não foram correlacionadas a nenhum dos tratamentos específicos ou combinações destes.

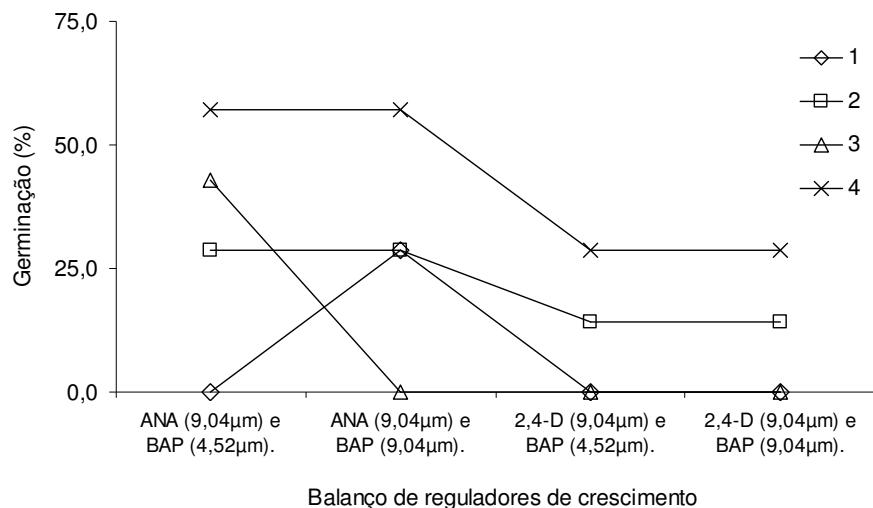


Figura 6 - Germinação normal em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam coletadas na fenofase fruto verde indeiscente, dispostas em meio de cultura contendo diferentes combinações entre 2,4-D ou ANA e BAP e diferentes posições de inserção no meio: 1=eixo hipocotilo/radicula perpendicular ao meio, radicula para baixo; 2=eixo hipocotilo/radicula paralelo ao meio, eixo menor na vertical; 3=eixo hipocotilo/radicula perpendicular ao meio, radicula para cima e 4=eixo hipocotilo/radicula paralelo ao meio, eixo menor na horizontal.

A posição de inserção que apresentou germinação com maior vigor (considerando como referência a primeira contagem da germinação) nas condições de cultura estudadas, foi a que apresenta maior probabilidade de ocorrência na dispersão natural, ou seja, o eixo hipocotilo/radicula paralelo ao meio e o eixo menor na horizontal (Figura 7). As demais posições estudadas retardam a germinação em maior ou menor grau, mas de forma similar. Apesar disso, ao final do período avaliado, ocorre um alto índice de germinação anormal associado a algumas posições de inserção das sementes.

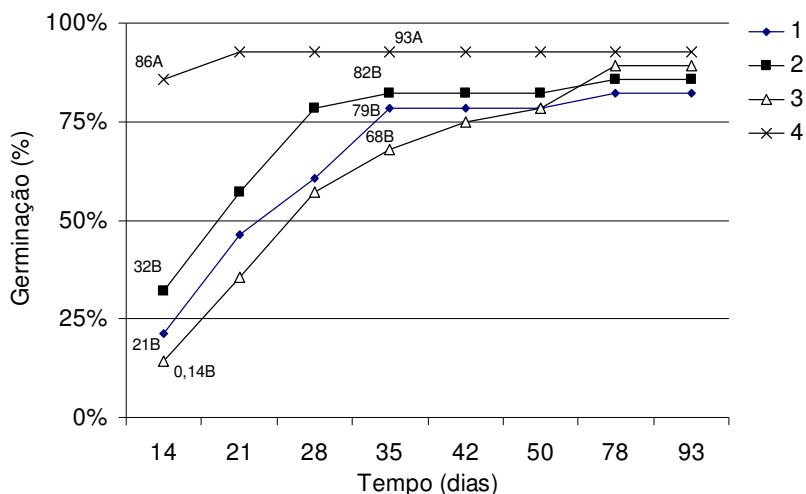


Figura 7 - Germinação ao longo do tempo em função da posição de inserção da semente de *Caesalpinia echinata* Lam no meio de cultura, independentemente do balanço de reguladores de crescimento, médias seguidas pela mesma letra, no mesmo período de cultura (dias), não diferem entre si pelo Testes de Duncan (p<0,05%).

Todos as combinações de reguladores de crescimento influenciaram a germinação de forma semelhante ao longo do tempo (Figura 8), apesar do balanço com 5,4 μ M de ANA e 4,4 μ M de BAP destacarem-se dos demais.

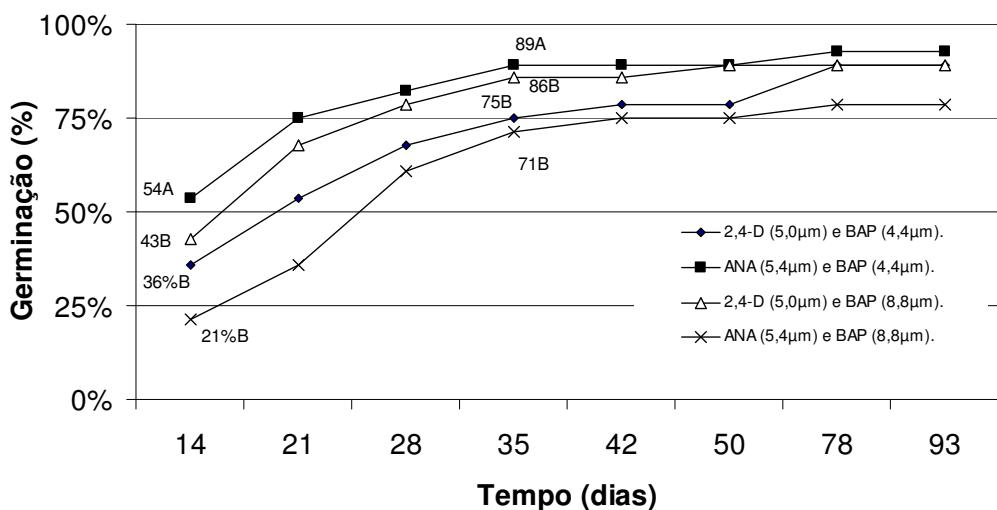


Figura 8 - Germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam ao longo do tempo em função do balanço de reguladores de crescimento, independentemente da posição de inserção da semente, , médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna (no mesmo tempo), não diferem entre si pelo Teste de Duncan (p<0,05%).

A calogênese iniciou-se mais rapidamente no meio de cultura contendo auxina (2,4-D ou ANA) combinada com 8,8 μ M de BAP (Figura 9).

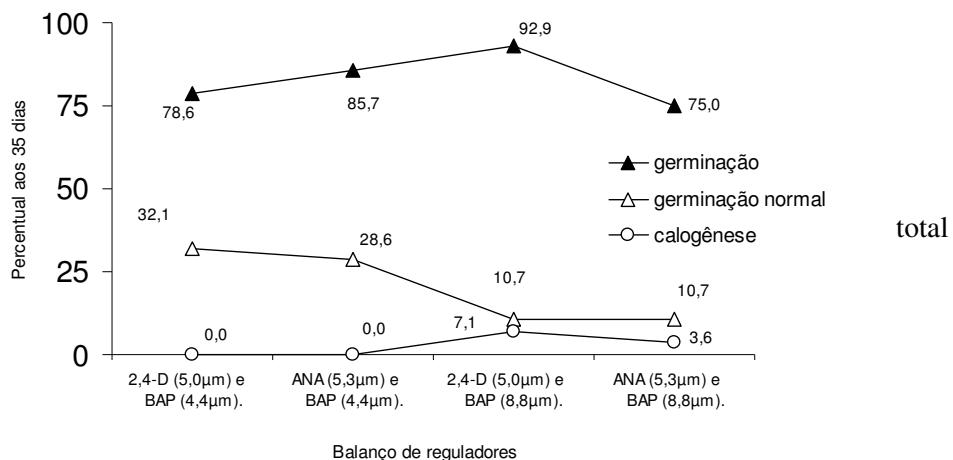


Figura 9 - Calogênese e germinação em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam coletadas na fenofase fruto verde indeiscente, dispostas em meio de cultura contendo diferentes combinações entre 2,4-D ou ANA e BAP, independente da posição de inserção no meio de cultura.

Ao confrontar os índices de germinação anormal e calogênese, verifica-se que a posição de inserção da semente no meio de cultura, que promove os mais baixos índices de germinação, é a mesma onde o processo de calogênese se inicia mais rapidamente (Figura 10). As condições que de alguma forma interferem negativamente na velocidade de germinação, podem ter contribuído para a canalização mais rápida dos recursos metabólicos disponíveis para o processo de calogênese induzido balanço de reguladores de crescimento.

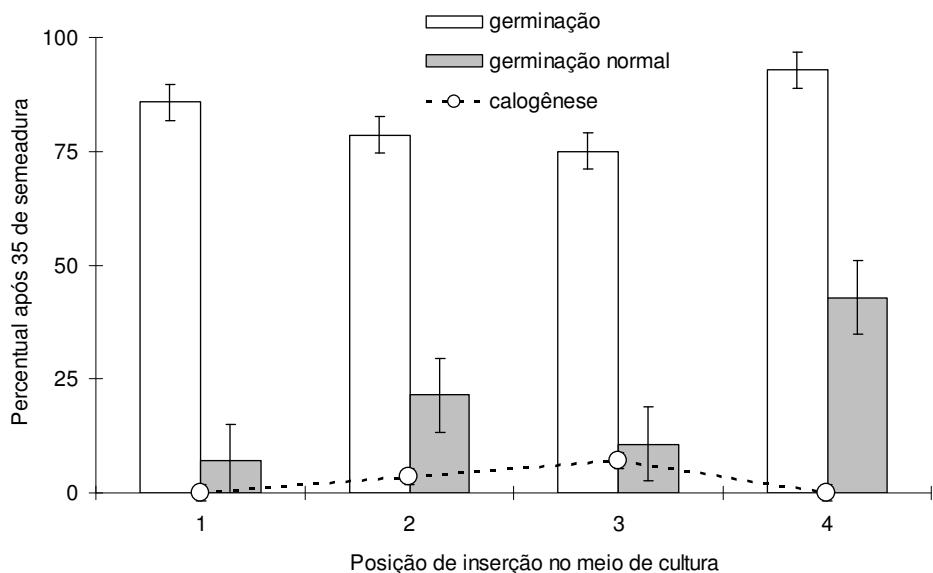


Figura 10 - Calogênese e germinação em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam coletadas na fenofase fruto verde indeiscente, de cultura dispostas em meio de cultura, aos 35 dias independente do balanço de reguladores, em diferentes posições de inserção no meio: 1=eixo hipocotilo/radicula perpendicular ao meio, radicula para baixo; 2=eixo hipocotilo/radicula paralelo ao meio, eixo menor na vertical; 3=eixo hipocotilo/radicula perpendicular ao meio, radicula para cima e 4=eixo hipocotilo/radicula paralelo ao meio, eixo menor na horizontal.

A freqüência de calogênese parece ter sido favorecida pela posição de inserção da semente no meio de cultura (Figura 11), principalmente após os 78 dias de cultura. Entretanto o delineamento estatístico adotado para esse ensaio preliminar cujo objetivo era somente eleger as condições que seriam utilizadas nos experimentos posteriores, não permite maiores inferências sobre esta questão. Sugerimos que esta variável seja melhor estudada, visto que apesar da falta de respaldo estatístico, observa-se que a posição de inserção da semente no meio de cultura tem influência no processo de germinação e de calogênese. As hipóteses que podem ser aventadas são relativas à influência da gravidade e/ou do nível de hipoxia imposto ao embrião pela imersão no meio de cultura.

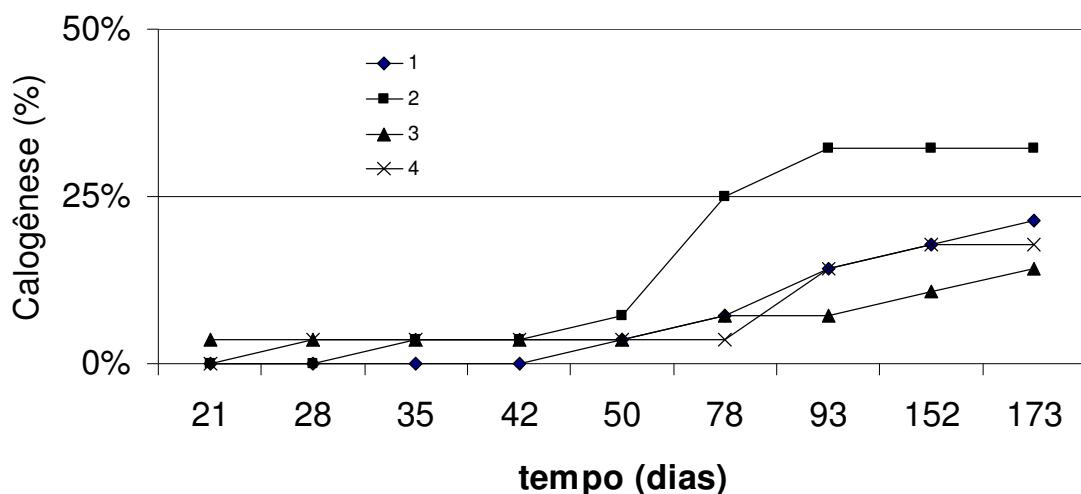


Figura 11 - Calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. no meio de cultura independentemente do balanço de reguladores, ao longo de 173 dias de cultura, em função da posição de inserção da semente: 1=eixo hipocotilo/radicula perpendicular ao meio, radicula para baixo; 2=eixo hipocotilo/radicula paralelo ao meio, eixo menor na vertical; 3=eixo hipocotilo/radicula perpendicular ao meio, radicula para cima e 4=eixo hipocotilo/radicula paralelo ao meio, eixo menor na horizontal.

No ensaio preliminar, sinais visíveis de calogênese foram observados a partir de 20 dias da cultura (Figura 12). Não foi detectada qualquer interação entre os fatores estudados, e diferença significativa entre os tratamentos com 2,4-D e com ANA, independentemente da concentração de BAP, foi aferida somente após 78 dias da cultura.

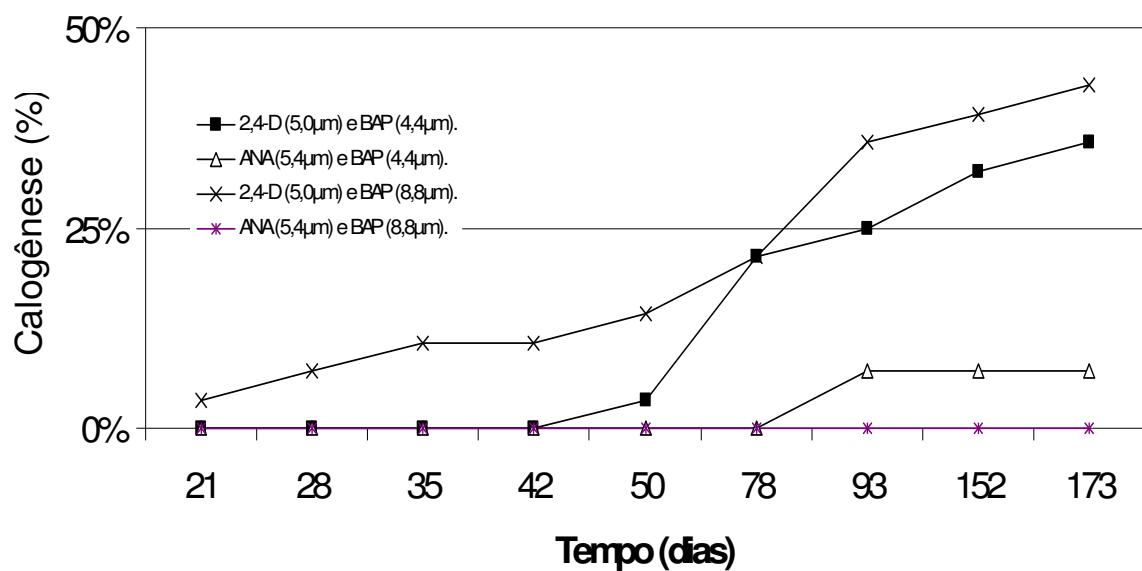


Figura 12 - Calogênese em função de diferentes combinações de reguladores de crescimento, independentemente da posição de inserção da semente *Caesalpinia echinata* Lam. no meio de cultura.

Foi possível observar a ocorrência de calogênese em sementes de frutos colhidos pouco antes da deiscência, em índices muito baixos em condições de cultura sem a presença de reguladores de crescimento, que apresentam indícios de associação com os mais altos índices de germinação anormal. (Figura 13 e 14). Ressalta-se que as sementes no estádio de desenvolvimento “1” não foram submetidas a este tratamento.

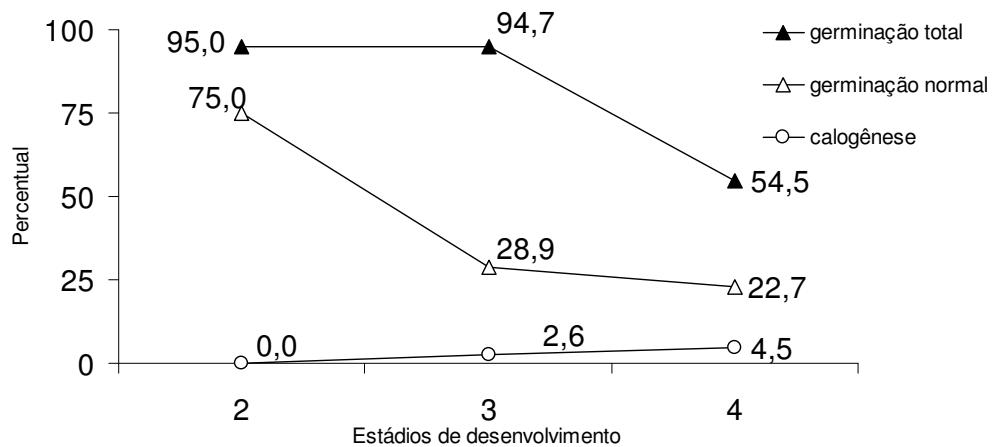


Figura 13 - Germinação e calogênese em sementes *Caesalpinia echinata* Lam. coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento e dispostas em meio de cultura sem reguladores de crescimento.

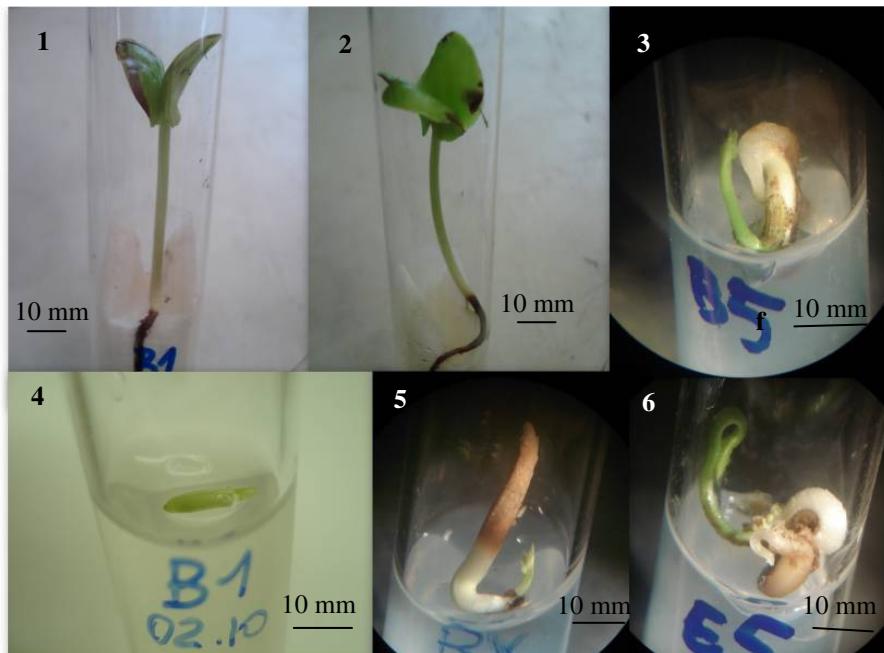


Figura 14 - Germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. sobre ponte de papel em tubo de ensaio (fotos 1 e 2) e cultura do embrião em meio nutritivo sem reguladores (fotos 3, 4, 5 e 6), notar desenvolvimento anômalo do embrião.

Analogamente ao afirmado para os estádios iniciais de crescimento, acredita-se que o balanço endógeno de reguladores de crescimento, juntamente com a composição nutricional do meio de cultura, induziram a calogênese de forma incipiente nestas condições, visto que os tecidos calosos foram formados em pequena quantidade, de aspecto filamentoso e logo se oxidaram.

Observou-se a iniciação e crescimento de calos com diferentes características morfológicas, de textura e coloração. Foi aferida a iniciação de calogênese ao longo de toda a plântula e principalmente no nó-cotiledonar e cotilédones (Figura 15).

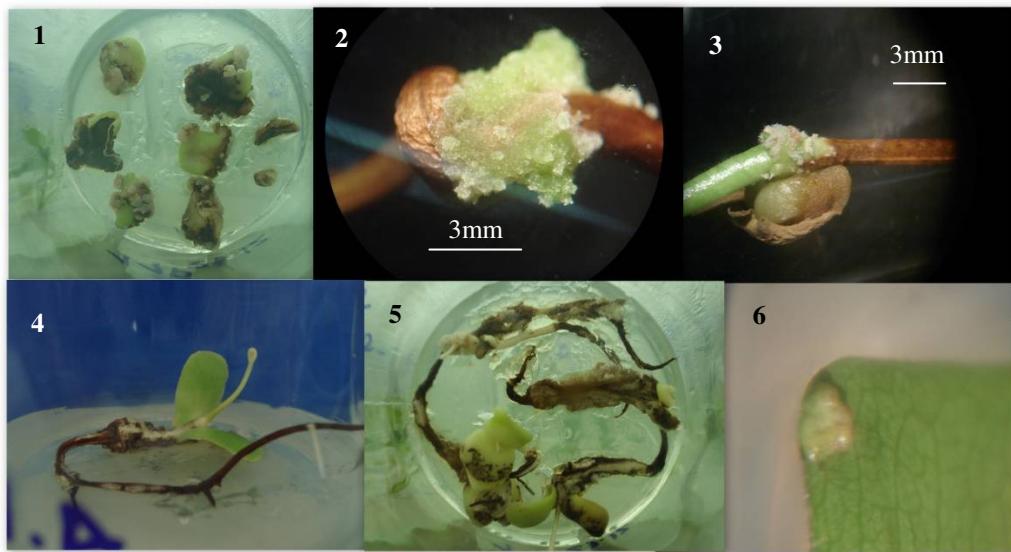


Figura 15 – Calogênese em *Caesalpinia echinata* Lam a partir de diferentes tipos de explante: 1) calos formados em cotilédones isolados; 2) no hipocôtilo de plântulas íntegras;; 3) no nó cotiledonar de plântulas íntegras; 4) no hipocôtilo de plântulas íntegras; 5) em plântulas segmentadas nestas diversas partes citadas; 6) em folíolos isolados.

A partir dos resultados dos ensaios preliminares foram realizados experimentos com a semente disposta sobre o meio de cultura como a ilustração nº 4 da Figura 2. Adotou-se a concentração mais elevada de 2,4-D no meio de cultura ($9,04\mu\text{M}$) em combinação equimolar com BAP, o que incrementou de forma significativa a freqüência de calogênese nos explantes, principalmente em sementes coletadas nos estádios iniciais do desenvolvimento do fruto (Tabela 9).

Tabela 9 – Freqüência média de contaminação e calogênese em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. aos 35 dias em meio contendo $9,04\mu\text{M}$ de 2,4-D e de BAP.

Coletas (DAF ¹)	Freqüência (%)	
	Contaminação	Calogênese
15	0 A ²	88,9 A ²
21	0 A	37,5 B
28	7,5 A	27,5 B
35	50,0 B	0 C
CV (%)	5,58	4,20

1- DAF = Dias após antese das flores.

2- Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo Testes de Duncan ($p<0,05\%$).

A imersão em solução aquosa com 72mg.L^{-1} de dicloro-S-Triazinetone de Sódio (Clorin™) por 20 minutos foi eficiente na limpeza da maioria dos explantes, principalmente para os que foram coletados nos estádios iniciais de desenvolvimento. A maior integridade dos tecidos do fruto no início de sua formação pode ter contribuído para a redução da presença de contaminantes nas sementes. Entretanto o tempo de exposição ao ambiente talvez seja o fator preponderante, visto que este princípio, da proteção promovida pelo órgão que

abriga o explante, não se aplica ao caso do pistilo, pois índices de contaminação em coletas antes e após a antese não diferiram estatisticamente (Tabela 11).

Tabela 10 – Freqüência média de calogênese observada aos 33 dias da cultura de pistilos de *Caesalpinia echinata* Lam. coletados antes e após antese das flores, em meio contendo 9,04 µM de 2,4-D e de BAP.

Coleta	Freqüência (%)	
	Contaminação ¹	Calogênese ¹
antes da antese	30,0	80,0
após a antese	43,3	53,3
CV (%)	4,82	4,84

1- A análise da variância não apontou diferença significativa entre os tratamentos.

Foi observada calogênese nos tegumentos presentes em sementes usadas como explantes e este potencial foi confirmado através de sua cultura, separadamente da semente, nas mesmas condições indutoras (Tabela 11 e Figura 16).

Tabela 11 – Freqüência média de calogênese observada aos 35 dias da cultura de tegumento separado da semente de *Caesalpinia echinata* Lam. coletada 35 DAF¹, em meio contendo 9,04 µM de 2,4-D e de BAP.

Tipo de explante inicial	Freqüência (%)	
	Contaminação ²	Calogênese ²
Semente nua (sem tegumento)	3,0	42,4
Tegumento isolado da semente	15,2	57,6
CV (%)	14,26	13,56

1- DAF = Dias após antese das flores.

2- A análise da variância não apontou diferença significativa entre os tratamentos.

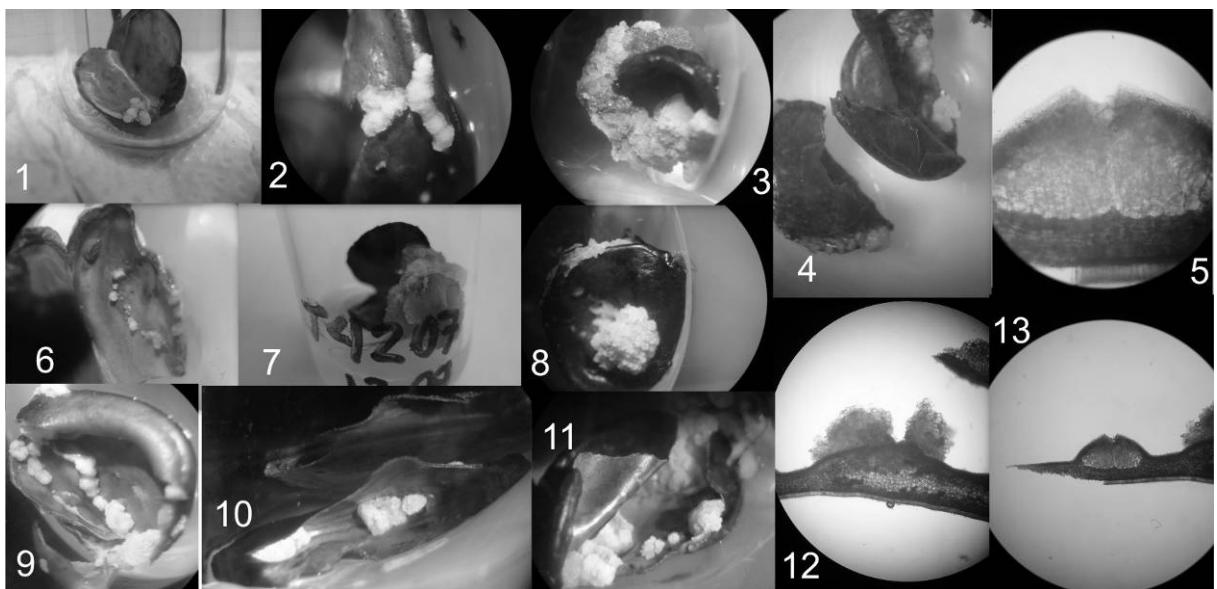


Figura 16 - Calos formados diretamente em tegumentos isolados das sementes, submetidos ao tratamento indutor de calogênese: 1-calos esverdeado nas bordas do tegumento; 2-calos brancos opacos, na face externa do tegumento; 3-calos heterogêneos, amarelados e esverdeados; 4-calos amarelados, compactos, na face interna e externa do tegumento; 5, 12 e 13- fotomicrografias de cortes transversais nos pontos de formação do calo da foto 4; 6-iniciação de calogênese na face interna do tegumento em tecido que pode ser resquício de endosperma na semente ainda imatura; 7- calos de aspecto gelatinoso; 8-calos esverdeados e brancos com superfície iniciando escurecimento; 9- calos friáveis, amarelados, no interior do tegumento; 10- calos friáveis, brancos no interior do tegumento; 11 – calos compactos, esverdeados no interior do tegumento de *Caesalpinia echinata* Lam.

Entre as hipóteses que podem ser sugeridas para a origem destes calos estão as da iniciação a partir de: 1) células de complexos estomáticos existentes no tegumento, conforme descritos por (Teixeira, Carmello-Guerreiro e Machado, 2004); 2) resíduos de tecido dos frutos aderidos ao tegumento e 3) resquícios de endosperma, principalmente nas sementes coletadas antes de seu completo desenvolvimento. A origem dos calos formados adquire importância do ponto de vista da variabilidade genética relacionada e consequentemente das implicações desta variabilidade, nas aplicações possíveis da cultura de tecidos vegetais. Desconsiderando-se a potencial ocorrência de variação somaclonal, os calos originados de células do complexo estomático no tegumento e de resíduos de tecidos do fruto devem apresentar o mesmo genótipo da planta matriz, visto que ambas as estruturas (tegumento e fruto) se originam de células com genótipo materno. O mesmo raciocínio se aplica aos calos oriundos de células do pistilo, ressalvada a possibilidade factível da origem destes ser o embrião. Mesmo em botões florais antes da antese, é possível a existência de tecidos embrionários, visto que a *C. echinata* Lam., que é predominantemente alógama, aparentemente não é autoimcompatível (Giudice-Neto, Sebbenn, Kageyama, 2005). A calogênese originada no endosperma, também desconsiderando a ocorrência de variação somaclonal, poderia teoricamente produzir calos triploides, no caso de plantas diplóides, sendo “2 n” de origem materna e “1 n” do pólen, visto que este tecido é resultante da dupla fecundação das angiospermas.

Folíolos de plantas adultas e de mudas mantidas em condições não axênicas mostraram-se viáveis para calogênese, entretanto os calos formados apresentam oxidação e

escurecimento em pouco tempo, sendo este fenômeno mais severo nos folíolos oriundos de plantas adultas. Os resultados corroboram Pessotti (2007) e Werner *et al* (2007) quanto ao melhor estádio de desenvolvimento do folíolo para indução de calogênese.

Pistilos e sementes imaturas são viáveis para calogênese nos diversos estádios de desenvolvimento testados, entretanto apresentam alto índice de contaminação quando colhidos de flores após a antese, possivelmente a alta presença de contaminantes é decorrente da intensa visitação de diversos insetos. Anteras são explantes viáveis para calogênese, entretanto apresentam alto índice de contaminação, mesmo quando obtidas de flores antes da antese, provavelmente pela intensa manipulação que requerem para sua excisão e a presença de muitos tricomas. As Figuras 17 a 19 ilustram alguns tipos de explantes utilizados e os tipos de calos observados.

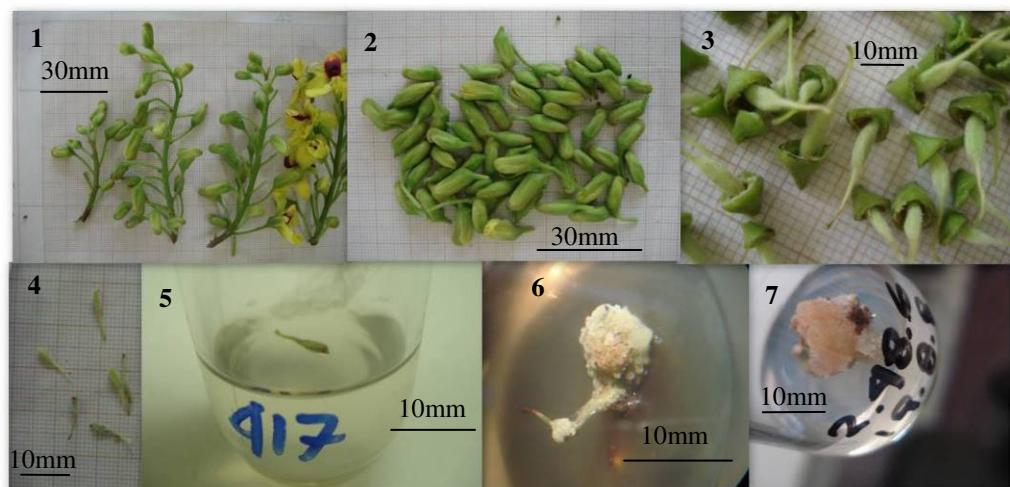


Figura 17 - Calogênese a partir de pistilos de *Caesalpinia echinata* Lam. como explante inicial da cultura em meio indutor: 1) inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento; 2) botões florais indeiscentes; 3) preparação do pistilo para limpeza superficial; 4) pistilos submetidos aos tratamentos de limpeza superficial; 5) isolamento sobre meio de cultura em tubos de ensaio; 6 e 7) calos friáveis, esverdeados (foto 6) e de coloração creme (foto 7);

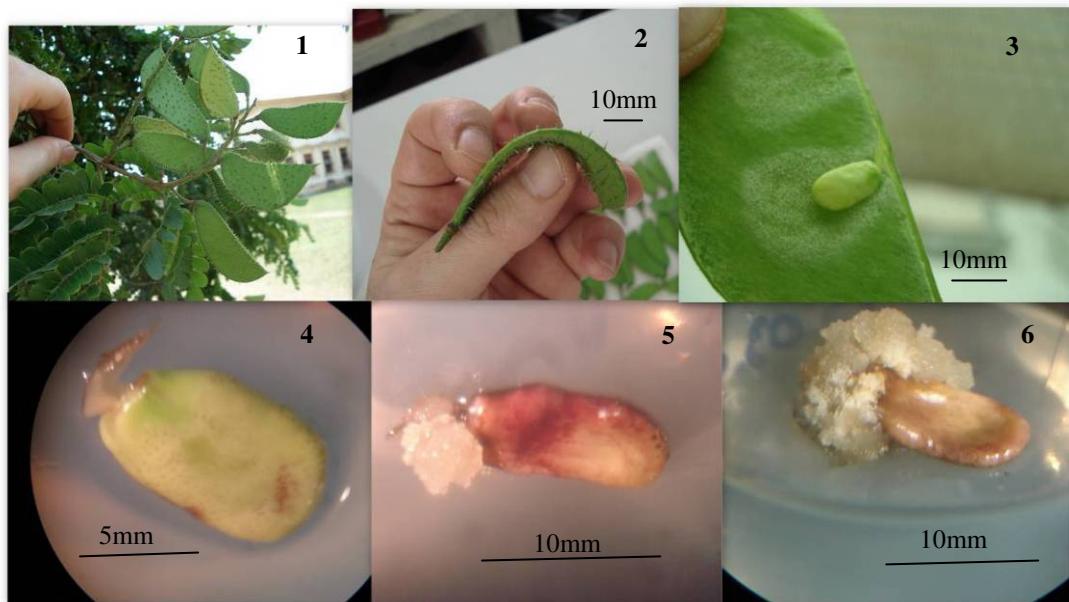


Figura 18 - Calogênese a partir de semente imatura de *Caesalpinia echinata* Lam. como explante inicial da cultura em meio indutor: 1) aparência da infrutescência no estádio inicial de desenvolvimento; 2) característica de flexibilidade do fruto utilizado para obtenção de sementes; 3) preparo da semente para tratamento de limpeza superficial; 4) semente isolada sobre meio de cultura em tubo de ensaio; 5) calos hialinos; 6) proliferação de calos friáveis de coloração branca.

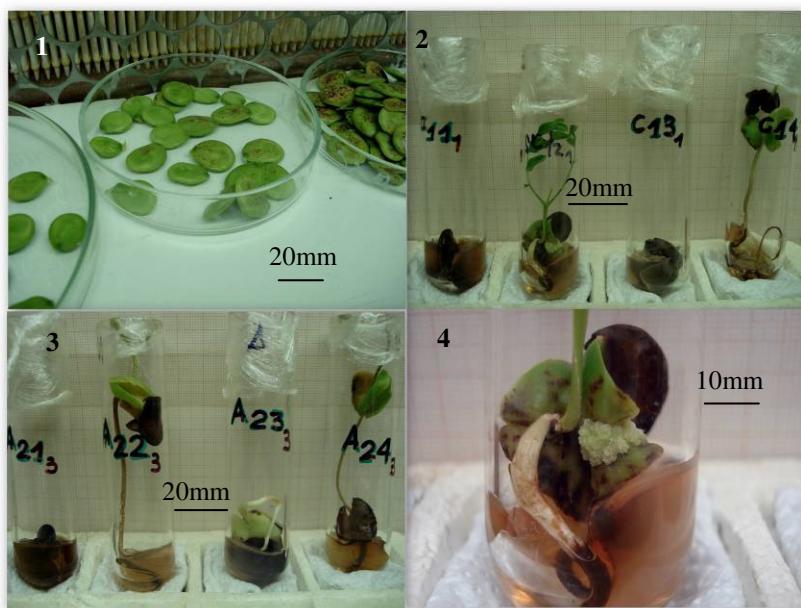


Figura 19 – Geminação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em tubo de ensaio sobre meio de cultura com balanço de reguladores indutor de calogênese: 1) sementes em adiantado estádio de desenvolvimento, colhidas de frutos ainda indeiscentes, após tratamento de limpeza superficial; 2) e 3) influência da posição da semente e dos reguladores de crescimento na germinação *in vitro*; 4) calos esverdeados, friáveis formados na região do nó cotiledonar das plântulas.

Os calos formados apresentaram diversidade de forma e coloração, que em alguns casos se modificaram ao longo da cultura, tanto pelo escurecimento dos tecidos quanto em modificações em suas características morfológicas iniciais (Figura 20).

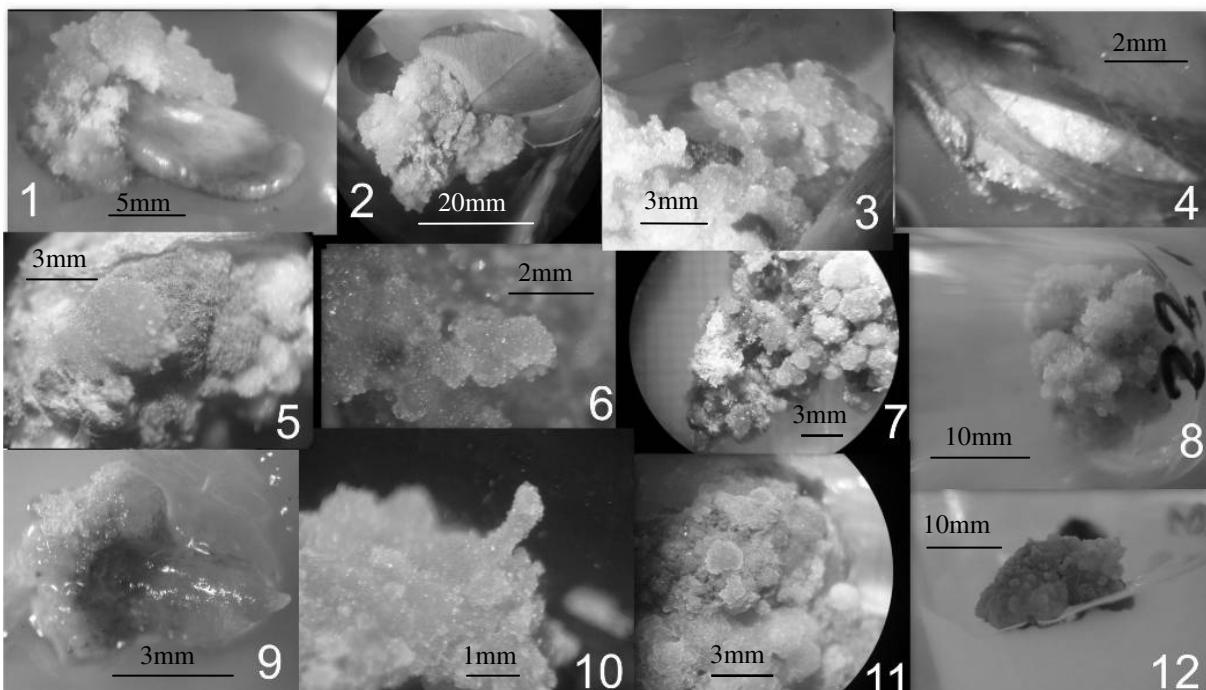


Figura 20 – Diversidade morfológica observada na calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam.: 1-calos friáveis, amarelados; 2-calos friáveis, escurecidos, oxidados; 3-calos hialinos; 4-calos filamentosos; 5-calo esverdeado, compacto, com pontos de oxidação; 6-calos com aparência gelatinosa; 7 –estruturas globulares e filamentosas hialinas e esverdeadas, compactas, em processo de escurecimento dos tecidos por oxidação; 8-calos homogêneos, friáveis, amarelados; 9-estrutura similar ao estádio de torpedo da embriogênese; 10-calos esverdeados em aglomerados em formatos globular e colunar; 11-calo heterogêneo, compacta no interior e friável na superfície, com estruturas globulares esverdeadas, amareladas e escurecidas pela oxidação; 12-calo homogêneo, compacto e esverdeado, com estruturas globulares na superfície.

Calos filamentosos, hialinos, translúcidos, com células沿ongadas foram observados principalmente na radícula, hipocótilo e epicótilo das plântulas, que também apresentaram calos friáveis, de coloração hialina, branca opaca, amarelada e verde. Os folíolos, cotilédones, o nó-cotiledonar, o tegumento e o pistilo apresentaram mais frequentemente calos friáveis e também compactos, de coloração variando de hialina, translúcida, branca, verde e amarelada. Estruturas globulares e colunares, formadas por aglomerados de células foram observadas principalmente nos calos esverdeados e naqueles morfológicamente heterogêneos. Estes calos heterogêneos foram observados mesmo quando as células inicialmente formadas eram homogêneas em cor e forma. Foram constatadas estruturas semelhantes às que foram descritas nos comunicados de Werner *et al* (2007) e Pessotti *et al* (2007) como estruturas pró-embriônicas (PEM).

A subcultura dos calos do tegumento demonstrou que a presença de 2,4-D e BAP em concentrações equimolares de 9,04 μ M mantêm maior freqüência de calos viáveis ao longo do tempo em comparação com a cultura mantida em meio desprovido de reguladores de

crescimento. Apesar de ter sido visualizada atividade celular de multiplicação nos calos mantidos em meio desprovido de reguladores de crescimento, esta ocorreu em menor freqüência e não houve a promoção do processo completo de embriogênese somática. O surgimento de novas células em culturas com mais de 12 meses foi observado em massas calosas aparentemente comprometidas pelo ressecamento do meio de cultura e escurecimento das células (Figura 21).

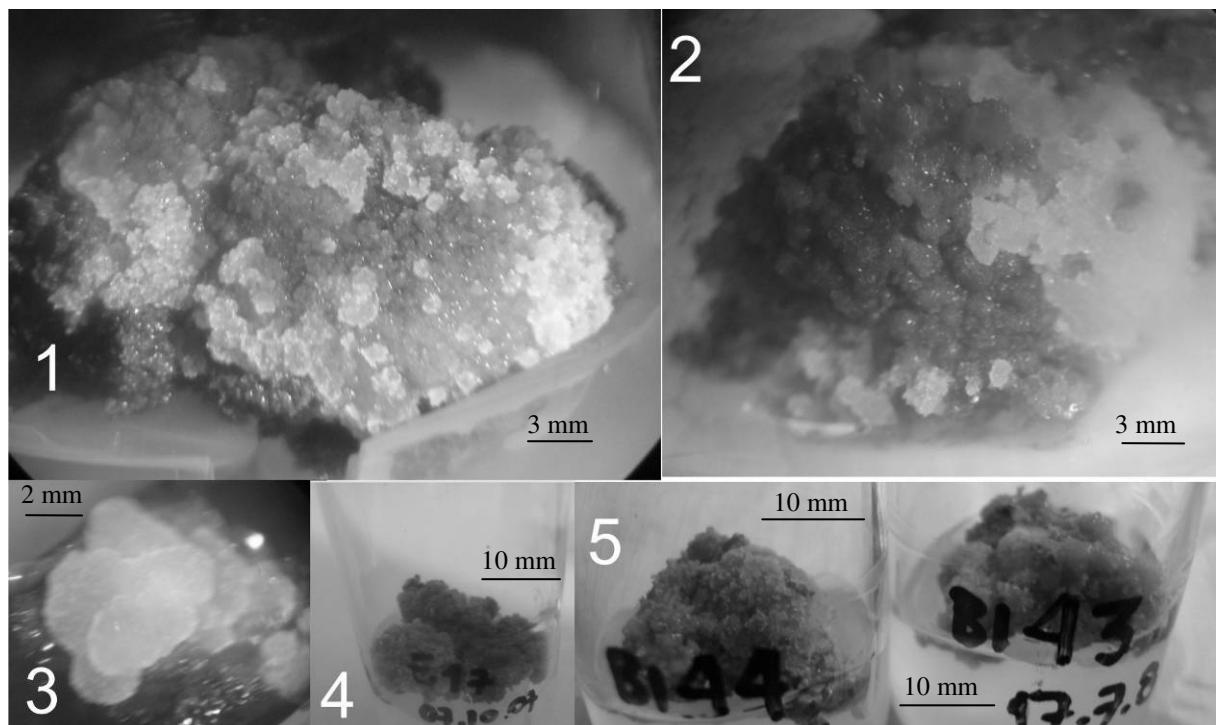


Figura 21 – Formação de novas células em cultura de longa duração de calos de *Caesalpinia echinata* Lam.: 1, 2 e 3 -proliferação de novas células friáveis, hialinas (1 e 3) e amarelas (2), em calos escurecidos, com mais de 6 meses de cultura; 4- massa calosa com mais de 12 meses de cultura, viáveis; 5-calos formados pela subcultura de calos com mais de 6 meses de cultura (dados não publicados).

3.6 - Conclusões

O uso de explantes extraídos de sementes coletadas de frutos ainda indeiscentes, principalmente no início da formação da semente, é uma estratégia eficaz para implantação de cultura axênica visando calogênese.

A concentração de 9,04 μM de 2,4-D em combinação equimolar com BAP, em meio de cultura MS (Murashige, Skoog, 1962) com metade da concentração salina, complementado com 100mg.L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose, 6g.L⁻¹ de agar e pH ajustado para 5,7 antes da autoclave, foi suficiente para induzir e manter calos formados a partir de diferentes tipos de explante, inclusive do tegumento isolado das sementes e do pistilo extraído antes da antese das flores.

Folióloos de plantas adultas e de mudas mantidas em condições não axênicas são viáveis para calogênese no meio indutor, entretanto os calos formados oxidam mais rapidamente, do mesmo modo que observado por Chu *et al* (2004).

Foram observados estruturas pró-embriónicas (PEM) semelhantes às comunicadas por Pessotti *et al* (2007) formadas em calos friáveis iniciados a partir do uso do tegumento de sementes extraídas de frutos indeiscentes como explante inicial.

Pistilos são explantes viáveis para calogênese nos diversos estádios de desenvolvimento testados, entretanto apresentam alto índice de contaminação quando colhidos de flores após a antese.

É possível obter e manter cultura celular da espécie por períodos de até 18 meses através de subcultura de calos friáveis no meio indutor, e o processo de escurecimento das células por oxidação por compostos fenólicos não foi fator limitante à manutenção de culturas de células potencialmente embriogênicas.

3.7 - Recomendações de Pesquisa

É importante investigar a origem dos calos gerados a partir do tegumento como explante inicial da cultura. Os prováveis tecidos que dão início à calogênese têm genomas distintos. O estômato presente no tegumento apresenta o genótipo da matriz, e o endosperma tem balanço genômico 2m:1p, decorrente da dupla fecundação que origina este tecido. O uso da regeneração indireta *in vitro* da espécie, como alternativa complementar a processos de conservação genética e as potenciais aplicações biotecnológicas da cultura de células com estes diferentes genomas, não podem prescindir da identificação da origem dos calos gerados a partir do uso do tegumento, extraído de sementes colhidas de frutos ainda indeiscentes, como explante inicial da cultura.

Recomenda-se estudar a indução da embriogênese somática da espécie através de subculturas das estruturas pró-embriónicas (PEM) produzidas em meio indutor para diferentes condições de cultura. Além dos ensaios com a subcultura das estruturas PEM em diferentes combinações de reguladores de crescimento, com diferentes concentrações osmóticas, fontes de nitrogênio, dentre outras condições que favoreçam a embriogênese, sugere-se testar o condicionamento do meio nutritivo, através de seu enriquecimento pela adição de meio anteriormente usado para a embriogênese de espécie filogeneticamente próxima da *Caesalpinia echinata* Lam.

3.8 - Referências Bibliográficas

BARBEDO, Claudio J.; BILIA, Denise A.C.; RIBEIRO, Rita de Cássia L. Figueiredo Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. 2002. Revista Brasil. Bot., V.25, n.4, p.431-439.

BRASIL, IBAMA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 06, DE 23 DE SETEMBRO DE 2008. (<http://www.ibama.gov.br>). Acesso em 29/01/2008.

CALDAS, Linda Styer; HARIDASAN, Padmaja; FERREIRA, Márcio Elias. Meios Nutritivos. In: Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. Vol I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. 1998 .Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH,

CHU, E.P.; TAVARES, A.R.; PESCADOR, R. & KERBAUY, Gilberto Barbante. Propagação in vitro de *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL). Simpósio "Pau-brasil: Ciência e Arte. 2003. "Auditório FAPESP" - São Paulo.

COSTA, Maria Angélica Pereira de Carvalho; SOUZA, Antônio da Silva; ALMEIDA, Weliton Antonio Bastos de. Morfogênese in vitro. in: SOUZA, Antônio da Silva e JUNGHANS, Tatiana Góes. Editores. Introdução à micropropagação de Plantas. Cruz das Almas ; Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

FLORIANO, Eduardo Pagel. Germinação e dormência de sementes florestais. Caderno Didático nº 2, 1^a ed. Santa Rosa, 2004. 19 p.

FRANÇA, Suzelei de Castro. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento / organizado por SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELOO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. 2004. 5^a Ed Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC.

GIUDICE-NETO, João Del, SEBBENN, Alexandre Magno, KAGEYAMA, Paulo Yoshio. Diversidade genética de uma população *ex situ* de *Caesalpinia echinata* Lam. SCIENTIA FORESTALIS. 2005. n. 69, p.125-133, dez.

MURASHIGE Toshio e SKOOG, Folk. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. 1962. Physiol Plant 15(3): 473-497.

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

NENARTAVIS, Erich Guimarães ; MIRANDA, Ricardo Motta; SILVA, Fabiano Guimarães; SOUZA, Cleiton Mateus ; COSTA, Alan Carlos. Otimização da produção *in vitro* de minitubérculos de *Solanum tuberosum* L. cv. Jeat Bintje, destinados a batata-semente. Agronomia, Seropédica. 2004. v. 38, n. 01, p. 32-36.

PESSOTTI, Kamila Vilas; WERNER, Elias Terra; LOPES, Fernando Pinto; CUZZUOL, Geraldo Rogerio Faustino. Indução e Expressão da Embriogenese Somática em *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) in vitro. Revista Brasileira de Biociências, Porto

Alegre, 2007. v. 5, supl. 2, p. 1056-1058.

PIJUT, Paula M.; WOESTE, Keith; VENGADESAN, G.; MICHLER, Charles H. Technological advances in temperate hardwood tree improvement including breeding and molecular marker applications. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*, 2007. 43:283-303.

SANTANA, Denise Garcia; RANAL, Marli. A. Análise da Germinação. Um enfoque estatístico. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004. 248p.

SILVA, Ilana Cruz. Caracterização, clonagem e expressão de um inibidor de elastase de neutrófilo humano, purificado de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil). São Paulo: s.n, 2006. [134]. Tese de Mestrado.

TEIXEIRA, Simone de Pádua; CARMELLO-GUERREIRO, Sandra Maria; MACHADO, Sílvia Rodrigues. Fruit and seed ontogeny related to the seed behaviour of two tropical species of *Caesalpinia* (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2004, 146, 57–70.

WERNER, Elias Terra; PESSOTTI, Kamila Vilas; LOPES, Fernando Pinto; CUZZUOL, Geraldo Rogerio Faustino. Indução da Calogênese de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) *in vitro*. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 2007. v. 5, supl. 2, p. 1053-1055.

YANG, Xuexi; CHEN, Hui; XU, Wenzhong; HE, Zhenyan; MA, Mi. Hyperaccumulation of arsenic by callus, sporophytes and gametophytes of *Pteris vittata* cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 2007. 26:1889-1897.

4-CAPÍTULO II

**APLICAÇÃO DO MÉTODO AFLP PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE
GENÉTICA DA CULTURA CELULAR *in vitro* DE *Caesalpinia echinata* Lam.**

4.1-Resumo

A capacidade de regeneração total de plantas, a partir de suas células ou tecidos, tem sido extremamente valiosa para a biotecnologia vegetal, é muito vantajosa para a preservação de genótipos e para a produção de compostos medicinais (França, 2004). O conhecimento dos níveis e padrões de diversidade genética é crucial para o desenvolvimento de estratégias de conservação da *Caesalpinia echinata* Lam. (Cardoso *et al*, 2005). A cultura não organizada de células pode ser explorada para a produção de metabólitos secundários (França, 2004). A síntese de certos compostos pode variar em função das condições, tempo e gerações da cultura, seja por alterações fisiológicas ontogênicas decorrentes de fatores exógenos e endógenos à célula ou ainda de variações epigenéticas e a nível de DNA (variação somaclonal). A regeneração de plantas via calogênese, também sofre reflexos destes aspectos, mesmo assim, culturas em suspensão e em biorreatores têm também servido para promover a otimização de sistemas de propagação, tornando-os mais competitivos economicamente (Winkelmann *et al*, 1998a; Hohe *et al*, 2001 *apud* Borchert *et al*, 2007). A calogênese *in vitro* de *Caesalpinia echinata* Lam. foi avaliada quanto a potencial ocorrência de variação somaclonal através da técnica AFLP (do inglês *amplified fragment length polymorphism*). Ao longo das subculturas de calos de *Caesalpinia echinata* Lam. foram coletadas amostras representando as diferentes condições de cultura (explante original, tipo de célula e número de subculturas. Com exceção das amostras das plantas matrizes, composta por foliólulos completamente expandidos, as demais amostras foram coletadas em duplicatas (replicata biológica) e em 15 amostras aleatórias foram utilizadas replicatas técnicas que eram constituídas de um nova série de digestão/ligação/amplificações do mesmo DNA. As amostras foram digeridas com as enzimas de restrição *EcoRI/MseI* e nas reações de amplificação seletiva foram utilizadas 4 combinações de iniciadores, duas combinações utilizadas por Cardoso *et al* (2005), *EcoRI-AGG* e *MseI-CTT*; *EcoRI-AGC* e *MseI-CTA* e mais outras duas escolhidas aleatoriamente, *EcoRI-ACC* e *MseI-CAT*. É viável a aplicação da técnica AFLP na cultura celular *in vitro* de *Caesalpinia echinata* Lam., entretanto se faz necessário o aperfeiçoamento da metodologia utilizada no processo de extração, sendo recomendável o teste de diferentes combinações de nucleotídeos na amplificação seletiva, para investigação de outras regiões do genoma da espécie, de modo a incrementar o poder de detecção de variação somaclonal.

Palavras-chave: calogênese. Variação somaclonal. pau-brasil

4.2-Abstract

The total capacity for regeneration of plants from their cells or tissues, has been extremely valuable for plant biotechnology, is very advantageous for the preservation of genotypes and for the production of medicinal compounds (França, 2004). Knowledge of levels and patterns of genetic diversity is crucial to the development of conservation strategies of *Caesalpinia echinata* Lam (Cardoso *et al*, 2005). The culture of non-organized cells can be exploited for the production of secondary metabolites (França, 2004). The synthesis of certain compounds can vary depending on the conditions, time and generations of culture, whether by ontogenetic physiological changes resulting from endogenous and exogenous factors to the cell or even epigenetic changes and the level of DNA (somaclonal variation). Plant regeneration via organogenesis, also suffers from reflections of these aspects, yet the suspension cultures and bioreactors have also served to promote the optimization of propagation systems, making them more economically competitive (Winkelmann *et al*, 1998a; Hohe *et al*, 2001 *apud* Borchert *et al*, 2007). Callus formation *in vitro* of *Caesalpinia echinata* Lam. was evaluated for the potential occurrence of somaclonal variation, by AFLP (amplified fragment length polymorphism). Over the subcultures of callus of *Caesalpinia echinata* Lam., samples were collected representing different culture conditions (original explant, cell type and number of subcultures). With the exception of samples from the stock plants, comprising leaflet fully expanded, all other samples were collected in duplicate (biological replicates) and in 15 random samples were used technical replicate, that were incorporated in a new series of digestion / binding / amplification of the same DNA. The samples were digested with restriction enzymes EcoRI / MseI and the selective amplification reactions were used four primer combinations, two combinations used by Cardoso *et al* (2005), EcoRI-AGG and MseI-CTT, EcoRI-AGC and MseI-CTA and two others chosen at random, EcoRI-ACC and MseI-CAT. Is feasible to apply the AFLP technique in cell culture *in vitro* of *Caesalpinia echinata* Lam., however if necessary the improvement of the methodology used in the extraction process, and recommended the testing of different combinations of nucleotides in the selective amplification, to investigate other regions of the genome of the species in order to increase the power of detection of somaclonal variation.

Keywords: callus; somaclonal variation; brazil wood.

4.3-Introdução

A conservação da diversidade das plantas é de crítica importância, pois esta desempenha papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas e possibilitam benefícios diretos à agricultura. A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores. Entretanto a possibilidade de obter plantas inteiras a partir de células isoladas, de tecidos e de órgãos de plantas pelo uso de técnicas de cultura de tecidos também levou ao estabelecimento dos bancos de germoplasma *in vitro* conforme descreveu Santos (2001). O comércio de plantas medicinais e de produtos fitoterápicos encontra-se em expansão em todo o mundo, e a regeneração de plântulas *in vitro* é uma técnica especialmente vantajosa para a obtenção de genótipos produtores de compostos medicinais (Cattelan *et al*, 2007). Silva (2006) descreve as proteases como enzimas que participam de diversos processos biológicos e patológicos, como a doença de Alzheimer, artrite e edema, e cita a elastase como uma das enzimas mais destrutivas do corpo. A mesma autora destaca que esta enzima, quando não controlada por seus inibidores endógenos, pode causar danos irreversíveis, sendo necessário o auxílio de inibidores exógenos para regular este processo. Um tipo importante de inibidor de proteinase (Kunitz-type serine proteinase inhibitor) foi encontrado em grandes quantidades em sementes de três leguminosas das subfamílias Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae, conforme descreve Silva *et al* (2004), que purificaram e caracterizaram uma proteína huPK (do inglês *Human plasma kallikrein*) denominada CeKI (do inglês *Caesalpinia echinata kallikrein inhibitor*) a partir das sementes de pau-brasil.

A cultura de tecidos vegetais, apesar de cara, vulnerável à perda accidental e susceptível à criação cumulativa de genótipos variantes (variação somaclonal), tem sua importância cada vez mais reconhecida na conservação de germoplasma, e no melhoramento genético, como fonte de variação para seleção (Withers e Williams, 1998). É essencial caracterizar e identificar as condições que favorecem a ocorrência de variação somaclonal (Pontaroli e Camadro, 2005). Conforme destacam Palombi e Damiano (2002) existem muitas estratégias para detectar esta variação genética, entretanto muitas das mudanças induzidas *in vitro* podem não ser observadas por padrões morfológicos, fenotípicos ou alterações na atividade biológica. Nestes casos a variação somaclonal pode ser detectada por técnicas de análise do DNA. Os mesmos autores destacam que vários marcadores têm sido aplicados para avaliar a estabilidade genética em plantas regeneradas por cultura de tecidos, destacando-se: RFLP (do inglês *restriction fragment length polymorphism*), AFLP (do inglês *amplified fragment length polymorphism*), RAPD (do inglês *random amplified polymorphic DNA*) e microssatélites (SSRs, do inglês *simple sequence repeats*).

A ocorrência de variação somaclonal ao longo da cultura de calos de *Caesalpinia echinata* Lam. foi investigada em função de diferentes explantes iniciais sob diferentes condições de condução da cultura. Para a consecução desta proposta foi usada a técnica AFLP baseada em PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), por permitir o uso de amostras de DNA com qualquer origem ou complexidade, e pelo fato de pequenas variações nas sequências poderem ser detectadas a partir de poucas quantidades de DNA. A simples variação das enzimas de restrição, da natureza e do número dos nucleotídeos seletivos, permite ainda gerar inúmeros marcadores, se constituindo em técnica extremamente eficiente para investigar um grande número de *loci* simultaneamente (Blears *et al*, 1998). Estas características são desejáveis para a investigação da ocorrência de variação somaclonal, na cultura de células

4.4-Material e Métodos

4.4.1-Coleta, tratamento e armazenamento das amostras

Ao longo das subculturas dos calos de *Caesalpinia echinata* Lam. foram coletadas amostras representando os diferentes tipos de células não diferenciadas cultivadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da concentração salina, complementado com 100mg.L⁻¹ de mio-inositol, 6g.L⁻¹ de agar, 3% de sacarose e pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem e após adição de 9,04µM de 2,4-D e de BAP. Amostras foram coletadas aos 15 e 33 meses de cultura, contínua ou com 3 e 4 subculturas. As amostras foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas, em congelador (-20°C), logo após a coleta, e posteriormente transferidas para temperatura de -70°C. Para a realização das análises foram utilizadas somente amostras de dois tipos de explantes iniciais (pistilo e tegumento). Com exceção das amostras das plantas matrizes, composta por foliolos completamente expandidos, as demais amostras foram coletadas em duplicatas (replicata biológica), de modo a garantir maior segurança contra o risco de perdas. Para 15 amostras aleatórias, foram utilizadas replicatas técnicas que eram constituídas de uma nova série de digestão/ligação/amplificações do mesmo DNA. As amostras analisadas representaram os calos com o maior tempo de cultura, esta estratégia foi adotada para evitar desperdício de recursos e para aumentar a chance de se detectar variação somaclonal, visto que a literatura aponta maior probabilidade deste fenômeno em associação com tempo e número de subculturas.

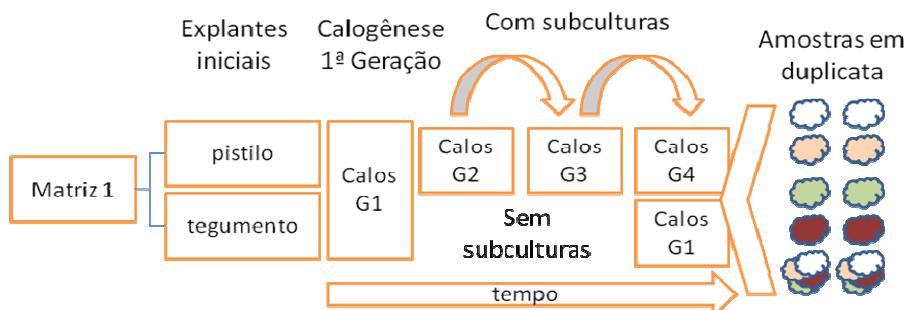


Figura 22 - Esquema geral da amostragem para avaliação de variação somaclonal na cultura celular *in vitro* de *Caesalpinia echinata* Lam.

4.4.2-Extração e quantificação do DNA total.

A maceração das amostras, cuja massa variou de 25 a 90mg, foi feita diretamente nos tubos de centrífuga (1,5mL), sem uso de nitrogênio líquido, com 350 µL da solução tampão de extração (2% CTAB; 1,42 M NaCl; 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8; 2% polivinilpirrolidona; 5,0 mM ácido ascórbico, 4,0 mM ácido dietiditiocarbamico-DIECA; 7µL de RNase A-20mg/mL) pré-aquecida a 65°C. Após maceração utilizando pistilos de material plástico com formato de encaixe perfeito com o fundo do tubo, a solução tampão foi completada para 700µL, homogeneizada completamente por inversão suave e mantida a 65°C por 60 minutos (banho-maria), com posterior resfriamento, em temperatura ambiente, por 10 minutos. A extração do homogeneizado foi feita com 570µL de clorofórmio:álcool isoamilico (24:1), misturado por inversão suave até formar uma emulsão que foi submetida a centrifugação por aproximadamente 5.000G por 10 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, com cuidado adequado para evitar

contaminação da interfase. Para a precipitação do DNA foi adicionado etanol absoluto em volume correspondente a 70% do volume recuperado da fase aquosa após centrifugação, e os tubos foram mantidos em temperatura -20°C por 15 dias. Após este período as amostras foram centrifugadas a 10.000G por 20 minutos, sendo descartado o sobrenadante deixando-se os tubos abertos sob fluxo até que o *pelet* formado pelo DNA secasse completamente. Após secagem completa dos *pelets* foi adicionado 10µL de água miliQ. A quantificação do DNA foi feita em eletroforese horizontal em gel de agarose (0,8%) por comparação das amostras com padrão de λ DNA (50 e 100ng/µL), em tampão TAE (1X), corados com Brometo de etídeo e visualizados em transluminador de UV para digitalização da imagem gerada.

4.4.3-Reações da AFLP

As amostras de DNA (2µL) foram digeridas por 2 h a 37°C com 0,8µL das enzimas de restrição *EcoRI/MseI* (1.25 unidade/µL) juntamente com 2,0µL de 5X tampão de reação (50mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM Acetato de magnésio e 250mM acetato-K), água para PCR (5,2µL). As enzimas de restrição foram inativadas através de aquecimento a 75 °C por 15 minutos, e os fragmentos clivados foram utilizados para a reação de ligação aos adaptadores. A Ligação foi feita com 4,8uL de adaptador (kit-Invitrogen) e 0,2uL de T4 ligase (1unidade/µL em 10mM de Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 50mM de KCl e 50% v/v de glicerol) para 5µL do produto da digestão a 20°C por 4 horas. O produto da digestão-ligação foi diluído (4x) e submetido a reação de pré-amplificação realizada em termociclagor (*Mastercycle 22331 Hamburg Eppendorf AG*) através de 28 ciclos a 94°C por 30 segundos seguido de 60 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Na pré-amplificação foram utilizados as enzimas 1,0µL *EcoRI*+A (50ng/µL); 2,0µL *MseI*+0 (50ng/µL); 0,5µL dNTP (10mM), 2,5 µL de água miliQ; 2,0µL tampão PCR (10X); 1,0 µL de MgCl₂ (50mM) e 0,1µL de Taq-polimerase (5 unid/µL). O material pré-amplificado foi diluído (2X) em tampão TE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; EDTA 1 mM) dos quais 5 µL foram utilizados para a amplificação seletiva por PCR. Foram utilizados 42 ciclos, sendo os 14 ciclos iniciais com uma redução gradual da temperatura de anelamento de 0,7°C a cada ciclo, iniciando-se em 65°C até atingir 56°C. Após esta etapa a reação seguiu por mais 28 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 1 minuto; e 72°C por 1 minuto seguido por uma extensão final de 72°C por 2 minutos. As reações de amplificação seletiva com 5 µL da amostra, se processaram em solução com 1 µL de cada enzima (50 ng/µL) com três bases seletivas de nucleotídeos das combinações testadas, 0,5 µL de dNTP (10mM), 2 µL de Tampão PCR (10X), 1 µL MgCl₂ (50mM), 0,08 µL de Taq DNA Polimerase e 10,52 µL de H₂O para PCR. Nestas reações de amplificação seletiva foram utilizadas 4 combinações de iniciadores, duas combinações utilizadas por Cardoso *et al* (2005), *EcoRI*+AGG e *MseI*-CTT; *EcoRI*+AGC e *MseI*-CTA e mais outras duas escolhidas aleatoriamente, *EcoRI*+ACC e *MseI*-CAT.

4.4.4-Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os fragmentos gerados na amplificação seletiva foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 19:1) segundo SAMBROOK *et al.* (1989), preparado com a mistura de 100 ml de solução estoque (450 g de uréia, 112,5 ml de acrilamida-bisacrilamida, 100 ml de TBE 10x e 4 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0), 100 µL de persulfato de amônio 25% e 100 µL de TEMED (N, N, N', N' – tetra metiletilenodiamina). As placas de vidro usadas com suporte do gel, foram limpas com etanol por três vezes, sendo posteriormente uma delas tratada com solução fixadora do gel (1mL de etanol absoluto, 5 µL

de ácido acético glacial e 3 μ l de Bind-Silane) e a outra com solução hidrófoba (pró-water-marca comercial) antes da aplicação do gel. Após a polimerização do gel (cerca de 1 hora após preparo da solução), a eletroforese utilizou aparato vertical, modelo “*Sequi-Gen® GT nucleic acid electrophoresis*” (BIO-RAD) contendo o tampão de corrida Tris-Borato-EDTA 1x (TBE) (89 mM Tris-Borato; 2 mM de EDTA) previamente aquecido a 55°C por cerca de 1 hora (pré-corrida). As amostras foram desnaturadas pela adição de tampão 98% formamida; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,025% cianol xileno e 0,025% azul de bromotimol na proporção de 1:1 (v/v), e aquecidas a 95°C por 5 minutos previamente à aplicação. As amostras desnaturadas, acondicionadas em gelo, após centrifugadas foram aplicadas ao gel (5 μ l da amostra e 5 μ l de loading buffer) e a migração se deu entre 45° e 55°C a 60 mA por cerca de 1:30h.

4.4.5-Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata e análise dos resultados.

Os fragmentos foram visualizados através de coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata utilizando o protocolo de coloração descrito por Creste *et al.* (2001) modificado de Beidlerr *et al.* (1982). Neste processo, após o término da corrida eletroforética, o gel foi banhado sob leve agitação respectivamente em: *Solução de Fixação* (Álcool Etílico 10% + Ácido Acético 1%) por 10 minutos; *Pré-tratamento* por 3 minutos em solução de ácido nítrico (1,5 %); *Solução de Impregnação* (Nitrato de Prata (AgNO_3) 0,2%) por 20 minutos; *Solução de Revelação* (Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) 3% + Formaldeído (37%) por 4-7 minutos e *Solução de Bloqueio* (Ácido Acético 5%). Com exceção da passagem entre a solução de revelação e de bloqueio, todas as trocas de solução foram intercaladas por lavagem em água destilada a 4°C por aproximadamente 1 minuto. Após secagem da placa em temperatura ambiente por 24 horas, o gel foi fotografado (digital) sobre transluminador de luz branca. A análise dos resultados foi feita através da aferição visual das bandas com boa resolução, anotando-se a presença (1) e ausência (0) destas marcas em cada amostra.

4.5-Resultados e discussão

A extração de DNA das amostras tanto da cultura inicial com pistilo quanto com tegumento foi eficiente somente em 29 (vinte e nove) de um total de 43 (quarenta e três) amostras. Não foi possível estabelecer qualquer relação entre o explante de origem, o tipo de calo ou as condições de cultura com o êxito do processo de extração. Entretanto observou-se que o escurecimento das células (oxidação) pode ter prejudicado o processo de extração. A potencial presença de polissacarídeos precipitados juntamente com o DNA também pode ter ocorrido, visto que algumas amostras cujas reações falharam, apresentavam elevada viscosidade em comparação as demais.

O teste com três combinações de iniciadores para a amplificação seletiva demonstrou que a reação com o par *EcoRI-AGC* e *MseI-CTA* gerou um padrão de amplificação de bandas de mais difícil visualização, em comparação com as combinações entre *EcoRI-AGG* e *MseI-CTT* e entre *EcoRI-ACC* e *MseI-CAT*. A coloração de prata mostrou-se bastante irregular para as diferentes amostras na mesma placa, independentemente da combinação de enzimas utilizada (Figura 23). Entretanto é possível afirmar que a baixa resolução observada, que dificulta a identificação de bandas nítidas, se deveu também à amplificação deficiente de alguns fragmentos. A ocorrência de bandas de difícil visualização, seja pela baixa resolução

em função de revelação deficiente ou pouca quantidade de DNA amplificado em determinado fragmento, reduziu consideravelmente o número de *loci* que puderam ser avaliados.

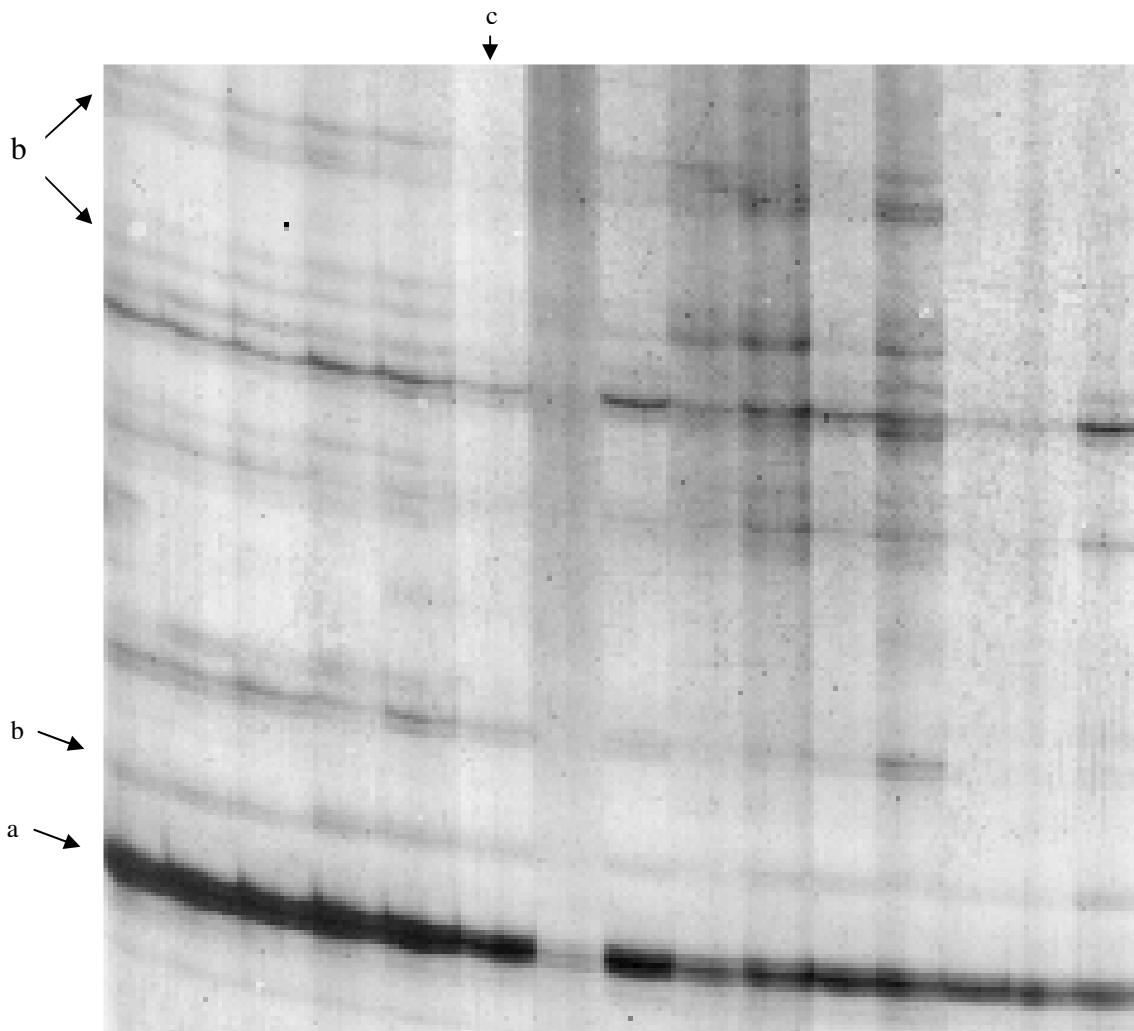


Figura 23 – Porção do gel de poliacrilamida corado por nitrato de prata após eletroforese: a) bandas monomórficas de boa resolução; b) bandas de baixa resolução; c) amostra com amplificação deficiente.

A combinação de iniciadores *EcoRI*-AGG e *MseI*-CTT produziu 21 (vinte e uma) bandas monomórficas em 15 (quinze) amostras aleatórias. As mesmas amostras, quando amplificadas com *EcoRI*-ACC e *MseI*-CAT apresentaram 18 (dezoito) bandas monomórficas de boa resolução, não sendo observadas bandas polimórficas em nenhum dos casos. A quantidade de bandas monomórficas observadas por Cardoso *et al* (2005) utilizando-se *EcoRI*-AGG e *MseI*-CTT em 3 populações naturais da espécie oscilou entre 19 e 48 por indivíduo analisado, em um total de 61 *loci* contabilizados por indivíduo.

Os resultados obtidos não permitiram a identificação de variação somaclonal na cultura celular da espécie. Independentemente do explante original da cultura (pistilo ou tegumento), do número de subculturas e do tempo da cultura, os fragmentos com boa resolução, de visualização inequívoca, só ocorreram para as bandas monomórficas observadas. Considerando que a calogênese a partir do uso do tegumento de sementes imaturas pode ter origem em células do estômato presente nestes tecidos, na ausência de variação somaclonal, o genoma deve ser idêntico ao da planta matriz. Na hipótese de calogênese a partir de células residuais do endosperma, presentes no tegumento submetido às

condições indutoras, a cultura deve apresentar conjunto de cromossomos não múltiplo de seu número básico, no caso da espécie em questão, $3n$ sendo $1n$ paterno, decorrente da dupla fecundação do óvulo. Neste caso espera-se que o genoma destas células em cultura, originada do endosperma, difira da planta matriz.

4.6-Conclusões

Foi possível aplicar a técnica AFLP na cultura celular *in vitro* de *Caesalpinia echinata* Lam. Entretanto é necessário que se façam ajustes na metodologia utilizada, para investigação de outras regiões do genoma da espécie.

As combinações utilizadas, de nucleotídeos seletivos e de enzimas, produziram um número pequeno de bandas com boa resolução, e todas foram monomórficas para todas as amostras, inclusive para cinco diferentes árvores adultas, usadas como amostras controle.

4.7-Recomendações de Pesquisa

Considerando que o número de fragmentos amplificados é determinado pela complexidade do DNA genômico, a combinação de enzimas, e o número e tipo de nucleotídeos seletivos presentes nos iniciadores (Blears *et al*, 1998) é recomendável que estas variáveis sejam ajustadas, principalmente através da modificação do número e tipo de nucleotídeos seletivos utilizados, de modo a abranger outras porções do genoma.

Outro aspecto muito importante que deve ser objeto de aperfeiçoamento para maior eficiência do método na investigação da ocorrência de variação somaclonal na cultura de células da espécie, é a extração do DNA dos calos, visto que as falhas na amplificação das amostras atingiram cerca de 50% das amostras. A presença de compostos fenólicos, principalmente nos calos escurecidos, provocam a oxidação irreversível do DNA, tornando-o inacessível às enzimas de restrição. Aumentar a concentração de PVP (polivinilpirrolidona) no tampão de extração, ou testar a utilização de outros agentes anti-oxidantes, tal como BSA (albumina de soro bovino) ou Beta-mercaptoetanol, pode contribuir para maior eficiência da extração. Observou-se que algumas amostras apresentavam viscosidade característica da presença de polissacarídeos, que interferem na migração do DNA em corridas eletroforéticas e também inibem a ação de enzimas de restrição.

A aplicação da técnica de microssatélites para investigação da potencial ocorrência de variação somaclonal também seria interessante, visto que a construção dos iniciadores, etapa mais onerosa deste processo, não seria fator limitante ao seu emprego para este propósito, pois estes iniciadores já existem para a *Caesalpinia echinata* Lam. (Lira *et al*, 2003; Melo *et al*, 2007).

4.8-Referências bibliográficas

BLEARS, M. J. ; DE GRANDIS, S. A ; LEE, H. ; TREVORS, J. T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial & Biotechnology*. 1998. 21, 99-114. Society for Industrial Microbiology.

BORCHERT, Thomas; FUCHS, Jorg; WINKELMANN, Traud; HOHE, Annette. Variable DNA content of *Cyclamen persicum* regenerated via somatic embryogenesis: rethinking the concept of long-term callus and suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Culture*. 2007 90:255-263.

CARDOSO, Sérgio Ricardo Sodré; PROVAN, Jim; LIRA, Catarina da Fonseca; PEREIRA, Luiza De Oliveira Ramos; FERREIRA, Paulo Cavalcanti Gomes; CARDOSO, Mônica Aires. High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. *Biodiversity and Conservation*. 2005. 14: 1047-1057.

CATTELAN, Letícia Vesz; STEIN, Vanessa Cristina; SOUZA, Sérgio Alessandro; Heiden, Gustavo; Büttow, Míriam Valli; Bobrowski, Vera Lúcia. Estabelecimento in vitro de Matricaria recutita. Utilizando Diferentes Condições de Cultivo. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 201-203, jul. 2007.

CHEN, D. -H; RONALD, P. C. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 53-57, 1999.

COSTA, Maria Angélica Pereira de Carvalho; SOUZA, Antônio da Silva; ALMEIDA, Weliton Antonio Bastos de. Morfogênese in vitro. in: SOUZA, Antônio da Silva e JUNGHANS, Tatiana Góes. Editores. *Introdução à micropropagação de Plantas*. Cruz das Almas ; Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. 2001. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.299-306.

FRANÇA, Suzelei de Castro. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento / organizado por SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros.* 2004. .5^a Ed Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC.

LIRA, C. F.; CARDOSO, S . R . S.; FERREIRA, P. C. G., CARDOSO, M. A.; PROVAN, J. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*. 2003. 12 , 3219-3225.

MELO, Sônia Cristina Oliveira; GAIOTTO, Fernanda Amat; CUPERTINO, Fernanda Barbosa; CORRÊA, Ronan Xavier; REIS, Alessandra Maria Moreira; GRATTAPAGLIA, Dário; BRONDANI, Rosana Pereira Vianello. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. *Conserv Genet* (2007) 8:1269-1271.

MURASHIGE Toshio e SKOOG, Folk. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. 1962. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

OLIVEIRA, Lúcio Garcia de; GOZZO, Andrezza Justino; NUNES, Viviane Abreu; SILVA, Ilana Cruz; SAMPAIO, Misako Uemura; SAMPAIO, Claudio Augusto Machado; ARAÚJO, Mariana da Silva. Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (paubrasil) - isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. v. 12, supl., p. 72-74, 2002.

PALOMBI, M.A.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Rep* (2002) 20:1061-1066.

PONTAROLI, Ana Clara e CAMADRO, Elsa Lucila. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures*. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 3, 423-430 (2005).

SANTOS, Izulm   R. I. Criopreserv  o de germoplasma vegetal. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 2001. n   20

SILVA, Ilana Cruz. Caracteriza  o, clonagem e expressão de um inibidor de elastase de neutrófilo humano, purificado de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil). São Paulo: s.n, 2006. Tese de Mestrado em Biologia Molecular-Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

SILVA, Ilana Cruz; GOZZO, Andrezza J.; NUNES, Viviane A.; CARMONA, Adriana K.; ALARIO, Adelaide Faljoni; OLIVA, Maria Luiza V.; SAMPAIO, Misako U.; SAMPAIO, Claudio A. M.; ARAUJO, Mariana S. A proteinase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIa. *Biol. Chem.*, 2004. Vol. 385, pp. 1083-1086.

WITHERS, Lyndsey A.; WILLIAMS, J. T. Conserva  o "in vitro" de recursos genéticos de plantas. In: *Cultura de Tecidos e transforma  o genética de plantas*. 1998. Vol. I. Editado por Antônio Carlos Torres; Linda Styer Caldas; José Amauri Buso. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH.