



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilardo

Estudos de criopreservação, análise fitoquímica e avaliação da estabilidade genética de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)

Rio de Janeiro

2019

Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilaro

**Estudos de criopreservação, análise fitoquímica e avaliação da estabilidade genética de
Cleome spinosa Jacq. (Cleomaceae)**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora, ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Vegetal da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Claudia Simões Gurgel

Coorientadora: Prof.^a Dra. Norma Albarello

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/A

V697

Vilardo, Anna Flávia Rodrigues Mortani.

Estudos de criopreservação, análise fitoquímica e avaliação da estabilidade genética de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae)/ Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilardo. 2019.

160f.

Orientadora :Claudia Simões Gurgel.

Coorientadora: Norma Albarello.

Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologias Roberto Alcantara Gomes.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura - Teses. 3. Matéria médica vegetal - Propagação in vitro - Teses. I. Gurgel, Claudia Simões. II. Albarello, Norma. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 -Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilaro

**Estudos de criopreservação, análise fitoquímica e avaliação da estabilidade genética de
Cleome spinosa Jacq. (Cleomaceae)**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora, ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Vegetal da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 11 de dezembro de 2019

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Claudia Simões Gurgel (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Jaqueline Gusmão da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Helena Regina Pinto Lima
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Renata de Oliveira Garcia
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Andréa, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Claudia Simões Gurgel pelos ensinamentos, dedicação, paciência, preocupação, carinho e palavras de incentivo. Sempre disposta a ajudar, por muitas vezes, você foi a minha estagiária sênior (a melhor que eu poderia ter). Muito obrigada por me encorajar, por me ouvir quando precisei, por me ensinar a plasmar, pois "no final tudo dá certo"! Muito obrigada por tudo ao longo desses anos. Tenho orgulho e sou muito grata por ser sua aluna.

À minha coorientadora Norma Albarello que sempre acreditou em mim. Mulher de mil e uma tarefas (talvez até um pouco mais), você desempenha todas com maestria. Você é um exemplo para mim! Muito obrigada por toda ajuda e apoio durante esses quase dez anos de Labplan. Só tenho a agradecer por todos os ensinamentos e pela contribuição em minha formação.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso. Estendo também este agradecimento à CAPES, agência de fomento que disponibilizou a bolsa de estudos que me ajudou a realizar este trabalho.

Aos professores que prontamente aceitaram integrar a banca de avaliação deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), local que por anos foi minha segunda casa e família: Aline Saavedra, Cecília Azevedo, Danúcia Castro, Débora Lage, Luciano Alves, Marcos dos Santos, Matheus Tirado, Tatiana Castro, Thaís Athayde, Victor Pelliccione e tantas outras pessoas especiais que passaram por aqui. Muito obrigada por todos os momentos de aprendizado e descontração. Vocês são maravilhosos... Estão no meu "turu-turu"!

Aos estagiários vinculados diretamente a esse projeto: Gustavo Lima, Jheniffer Martins, Marília Campos e Thaís Fortunato. Vocês contribuíram demais para este trabalho. Muito obrigada por toda ajuda, dedicação e pelos momentos agradáveis que passamos. Vocês aprenderam comigo e eu com vocês!

À bióloga, bolsista e amiga Livia por toda ajuda nas análises moleculares. Muito obrigada também por ter me treinado nas técnicas de criopreservação quando iniciei nessa empreitada. Você é uma pessoa incrível, dedicada, focada... maravilhosa!

Aos farmacêuticos Eduardo Nunes e Iranilda Calado pelo auxílio nas análises cromatográficas realizadas no Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais e Central Analítica Fernanda Coutinho do Instituto de Química, ambos da UERJ. Muito obrigada por toda ajuda!

À bióloga e bolsista Adriana Lanzotti por todo o apoio dado durante os experimentos e pelas ilustrações impecáveis que compõem esse trabalho.

Ao pesquisador Dr. Florent Engelmann, do *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD) por nos ceder as crioplacas e realizar a capacitação dos integrantes do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ nas técnicas de V- e D-Crioplaca. Agradeço também por todos os ensinamentos, críticas e sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho.

Às amigas Bruna Bantin, Gabriela Fernandes, Juliana Mello, Lauana Coimbra, Thaís Forte e Thaís Tanini pela compreensão, desabafos e momentos alegres. Vocês tornaram o meu caminho mais leve e descontraído. Obrigada por estarem sempre torcendo por mim!

Ao meu namorado Márcio Morais por sempre me apoiar, me ouvir, encorajar e não medir esforços para me ajudar. Obrigada por me auxiliar com as imagens deste trabalho. Elas ficaram lindas! Amo você!

A toda minha família por entender minha ausência quando necessário, pelos momentos felizes e de união compartilhados. Em especial aos meus avós, Annina e Benito, pelo exemplo de amor e fé, sempre presentes em minha vida.

À minha avó Catharina que de fato foi, e é, a minha segunda mãe. Muito obrigada por todo o amor, carinho e por compreender minhas ausências. Por vezes você vinha na porta do meu quarto espiar o que eu estava fazendo e voltava para a sala para não me atrapalhar. Que a alegria do dia de hoje possa recompensar todos esses momentos.

Aos meus pais por terem me dado o bem mais precioso e ensinado os valores que carrego comigo. Obrigada por terem investido na minha educação! Essa conquista também é de vocês! Amo vocês!

Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente.

Roger Von Oech

RESUMO

VILARDO, A. F. R. M. **Estudos de criopreservação, análise fitoquímica e avaliação da estabilidade genética de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae).** 2019. 160f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Sistemas de conservação de germoplasma baseados na cultura de tecidos vegetais estão sujeitos a contaminações e perdas do seu potencial morfogênético. Estes problemas podem ser evitados pelo estabelecimento da criopreservação, método que permite a conservação em longo prazo de material biológico por meio da imersão em nitrogênio líquido. O presente trabalho teve por objetivos a criopreservação de ápices caulinares obtidos de plantas produzidas *in vitro* de *Cleome spinosa*, empregando as técnicas de vitrificação e dessecação com uso de crioplacas (V-Crioplaca e D-Crioplaca, respectivamente), além da avaliação da estabilidade genética e fitoquímica do material criopreservado. Para a técnica de V-Crioplaca, foi avaliada a etapa de recuperação, com o emprego de diferentes concentrações e períodos de cultivo na presença do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP). Os ápices foram submetidos a tratamento com a solução PVS2 (25°C ou 0°C), empregando protocolos previamente estabelecidos para a espécie. No presente estudo, os maiores percentuais de sobrevivência (83%) e recuperação (76%) foram obtidos utilizando ápices caulinares pré-cultivados em meio MS com concentrações crescentes de sacarose (0,25 M - 0,5 M), expostos à PVS2 por 90 minutos (0°C) e submetidos à etapa de recuperação em meio contendo 0,5 mg.L⁻¹ de BAP por 15 dias. Para a técnica de D-Crioplaca, empregada pela primeira vez para a espécie, foram avaliados o efeito do pré-cultivo, alteração na concentração de sacarose na solução de polimerização, tratamento com solução de *loading*, exposição à sílica gel e tempo de cultivo em presença de BAP durante a recuperação dos ápices caulinares. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento mais eficiente consistiu no pré-cultivo em concentrações crescentes de sacarose (0,25 M - 0,5 M) por 48h, fixação às crioplacas com auxílio de solução de polimerização contendo 0,6 M de sacarose, seguido de exposição ao *loading* (20 min) e dessecação em sílica gel por 60 min. A etapa de recuperação ocorreu em meio MS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP por 15 dias, com posterior transferência do material para meio MS0. Este protocolo resultou nas maiores porcentagens de sobrevivência (76%) e recuperação (70%), após a criopreservação por D-Crioplaca. A aclimatização e as análises molecular e fitoquímica, foram realizadas com plantas regeneradas após a criopreservação empregando a técnica de V-Crioplaca. As plantas desenvolvidas a partir de ápices criopreservados, alcançaram uma taxa de aclimatização de 100%, e apresentaram aspecto fenotípico normal. A análise da estabilidade genética visou comparar as plantas regeneradas após o processo de criopreservação (-NL e +NL) com suas respectivas plantas matrizes, empregando as técnicas de marcadores moleculares SCoT e ISSR. As análises SCoT revelaram um baixo grau de polimorfismo, sendo encontrado apenas um único fragmento polimórfico, enquanto que pela técnica ISSR não foram encontrados polimorfismos para os fragmentos analisados. Extratos metanólicos de plantas regeneradas após a criopreservação (+NL), plantas propagadas *in vitro* e plantas coletadas a campo foram submetidos a análise por cromatografia líquida de alta eficiência visando a comparação de seu perfil fitoquímico. Os resultados demonstraram que a amostra de campo apresentou uma maior diversidade de substâncias, enquanto as plantas propagadas *in vitro* mostraram perfis cromatográficos similares. Os estudos realizados com *C. spinosa* demonstraram a viabilidade do uso das técnicas de criopreservação para a conservação em longo prazo de materiais biotecnológicos estabelecidos com a espécie.

Palavras-Chave: Aclimatização. Conservação em longo prazo. Cromatografia. D-Crioplaca. Marcadores moleculares. Planta medicinal. V-Crioplaca.

ABSTRACT

VILARDO, A. F. R. M. **Studies on cryopreservation, phytochemical analysis and genetic stability of *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae).** 2019. 160f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Germplasm conservation systems based on plant tissue culture are subject to contamination and loss of their morphogenetic potential. These problems can be circumvented by the establishment of the cryopreservation, a method that allows long-term conservation by immersion of the biological material into liquid nitrogen. The objectives of this study were the cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plant of *Cleome spinosa* using vitrification and desiccation techniques in cryo-plates (V-Cryo-Plate and D-Cryo-Plate, respectively) and evaluation of genetic and phytochemical stability. For the V-Cryo-plate technique, the recovery was evaluated using different concentrations and exposure time to benzylaminopurine (BAP). The shoot tips were treated with the PVS2 solution (25°C or 0°C), applying protocols previously established to the species. In the present work, the highest percentages of survival (83%) and recovery (76%) were achieved for shoot tips exposed to PVS2 for 90 min (0°C) and recovered on MS medium supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ BAP for 15 days. The D-Cryo-Plate technique was applied for the first time with *C. spinosa*. The effect of pre-culture treatment, sucrose concentration on polymerization solution, exposure to loading solution and to silica gel as well as the recovery medium were evaluated. The highest percentages of survival (76%) and recovery (76%) rates after cryopreservation were achieved using the followed protocol: Pre-culture with increasing concentrations of sucrose (0.25 M - 0.5 M) for 48 h, fixation to cryo-plates with the polymerization solution containing 0.6 M sucrose, followed by exposure to loading (20 min) and desiccation on silica gel for 60 min. The recovery was performed on MS medium supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ BAP for 15 days. Acclimatization process, molecular and phytochemical analysis were performed with plants regenerated after cryopreservation using the V-Cryo-plate technique. The cryopreserved plants achieved 100% acclimatization rate and showed a normal phenotypic aspect. The analysis of genetic stability aimed to compare the regenerated plants after the cryopreservation process (-NL and + NL) with their mother plants, using the molecular makers SCoT and ISSR. The SCoT analysis revealed only a single polymorphic fragment, while using the ISSR no polymorphisms were detected. Methanolic extracts of cryopreserved plants (+ NL), *in vitro* propagated plants and field collected plants were subjected to analysis by high performance liquid chromatography to compare their phytochemical profile. The results showed that the field sample presented a greater diversity of substances, while the *in vitro* propagated plants showed similar phytochemical profile. The studies conducted with *C. spinosa* demonstrated the feasibility of cryopreservation techniques for long-term conservation of biotechnological materials established with the species.

Key words: Acclimatization. Chromatography. Long-term conservation. D cryo-plate. Medicinal plant. Molecular markers. V cryo-plate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Aspectos morfológicos de <i>Cleome spinosa</i>	36
Figura 2 -	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> : estudos realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN/NBV/UERJ).....	39
Figura 3 -	Estudos de criopreservação com <i>C. spinosa</i> através da técnica de V-Crioplaca.....	40
Figura 4 -	Ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> utilizados na criopreservação.....	43
Figura 5 -	Etapas metodológicas estabelecidas para a técnica de V-Crioplaca.....	45
Figura 6 -	Etapas metodológicas estabelecidas para a técnica de D-Crioplaca.....	48
Figura 7 -	Etapas metodológicas empregadas para a Aclimatização das plantas.....	49
Figura 8 -	Etapas metodológicas para a seleção do material botânico utilizado para as análises moleculares.....	51
Quadro 1 -	<i>Primers</i> utilizados na triagem inicial para as técnicas de SCoT e ISSR...	54
Figura 9 -	Etapas metodológicas empregadas para a preparação e extratos metanólicos por maceração.....	56
Figura 10 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à PVS2 a 0°C por 60 min e posterior recuperação em meio MS com 0,1 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	60
Figura 11 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 25°C e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	63
Figura 12 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 0°C e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	64
Figura 13 -	Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 (0°C) por 90 min e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP por 30 dias.....	65
Figura 14 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 25°C e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.....	70

Figura 15 - Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 0°C e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.	71
Figura 16 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 (0°C) por 90 min e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.	72
Figura 17 - Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 25°C e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.....	75
Figura 18 - Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 0°C e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.	76
Figura 19 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 (0°C) e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.	77
Figura 20 - Respostas regenerativas de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> após pré-cultivo em meio MS enriquecido com altas concentrações de sacarose...	79
Figura 21 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> expostos à sílica gel por diferentes períodos de tempo e posterior recuperação em meio MS acrescido de 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP por 30 dias.....	81
Figura 22 - Respostas morfogênicas de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	86
Figura 23 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, após 60 dias do tratamento de dessecação em sílica gel.....	86
Figura 24 - Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 40 min de exposição à solução de <i>loading</i> e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	87
Figura 25 - Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 40 min de exposição à solução de <i>loading</i> e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 60 dias.	87
Figura 26 - Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando solução de <i>loading</i> contendo 0,8	

	M de sacarose por um tempo de exposição de 20 minutos e recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	88
Figura 27 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	92
Figura 28 -	Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	92
Figura 29 -	Desenvolvimento de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.....	93
Figura 30 -	Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	93
Figura 31 -	Aclimatização de plantas de <i>C. spinosa</i> regeneradas a partir dos processos de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca.....	95
Figura 32 -	Comparação de métodos de extração e quantificação do DNA genômico de <i>C. spinosa</i>	97
Figura 33 -	Padrões de amplificação por SCoT produzidos em amostras de DNA de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i>	99
Figura 34 -	Padrões de amplificação por SCoT produzidos a partir de amostras de DNA de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> utilizando duas temperaturas de anelamento distintas.....	100
Figura 35 -	Padrões de amplificação por SCoT produzidos a partir de amostras de DNA de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> utilizando Taq DNA polimerase a duas concentrações distintas.....	100
Figura 36 -	Padrões de amplificação por SCoT produzidos a partir amostras de DNA de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> utilizando 2,5 U Taq DNA polimerase a duas temperaturas de anelamento distintas.....	101
Figura 37 -	Padrões de amplificação por SCoT a partir de amostras de DNA de plantas oriundas de tratamentos de V-Crioplaca de <i>C. spinosa</i>	105
Figura 38 -	Padrões de amplificação por ISSR produzidos a partir de amostras de DNA de plantas propagadas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i> utilizando 2,5 U Taq DNA polimerase a diferentes temperaturas de anelamento.....	107

Figura 39 - Padrões de amplificação por ISSR a partir de amostras de DNA de plantas oriundas de tratamentos de V-Crioplaca de <i>C. spinosa</i>	111
Figura 40 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 254 nm a partir de extratos metanólicos brutos de <i>C. spinosa</i>	115
Figura 41 - Dendograma gerado pelo método de Cluster usando o Coeficiente de Jaccard para os diferentes extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i>	117
Figura 42 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 480m nm (50 - 60 min) a partir de extratos metanólicos brutos de <i>C. spinosa</i>	119
Figura 43 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 340 nm (5 - 25 minutos) a partir de extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i>	122
Figura 44 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 340 nm (25-30 minutos) a partir de extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i>	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Criopreservação de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> pela técnica de V-Crioplaca utilizando a suplementação do meio de recuperação com 0,1 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.....	59
Tabela 2 -	Criopreservação de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> pela técnica de V-Crioplaca utilizando a suplementação do meio de recuperação com 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP, por 30 dias.	62
Tabela 3 -	Criopreservação de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> pela técnica de V-Crioplaca utilizando a suplementação do meio de recuperação com 0,1 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.	66
Tabela 4 -	Criopreservação de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> pela técnica de V-Crioplaca utilizando a suplementação do meio de recuperação com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.	69
Tabela 5 -	Criopreservação de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> pela técnica de V-Crioplaca utilizando suplementação do meio de recuperação com 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP, por 15 dias.....	74
Tabela 6 -	Determinação do teor hídrico e da taxa de regeneração de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> cultivados em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP.....	79
Tabela 7 -	Determinação do teor hídrico e da taxa de regeneração de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> expostos à solução de <i>loading</i> seguido pela dessecação em sílica gel por diferentes períodos de tempos.....	81
Tabela 8 -	Criopreservação de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> pela técnica de D-Crioplaca utilizando a solução de <i>loading</i> com diferentes concentrações de sacarose e tempos de exposição.....	85
Tabela 9 -	Criopreservação de ápices caulinares de <i>C. spinosa</i> pela técnica de D-Crioplaca utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e recuperação em meio MS com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP.....	91
Tabela 10 -	Altura média e número de folhas de plantas de <i>C. spinosa</i> ao longo do processo de aclimatização.....	94
Tabela 11 -	Número e tamanho de produtos de amplificação obtidos na triagem dos <i>primers</i> utilizados para a técnica SCoT.....	102
Tabela 12 -	Características dos produtos de amplificação detectados com os 10 <i>primers</i> utilizados nas análises SCoT realizadas com plantas regeneradas de <i>C. spinosa</i>	104

Tabela 13 -	Número e tamanho de produtos de amplificação obtidos na triagem inicial dos <i>primers</i> para a técnica ISSR.....	109
Tabela 14 -	Características dos produtos de amplificação detectados com os quinze <i>primers</i> utilizados nas análises ISSR.....	110
Tabela 15 -	Similaridade genética, de acordo com o Coeficiente de Jaccard, obtida por análise SCoT e ISSR.....	112
Tabela 16 -	Rendimento dos extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i> obtidos a partir de material coletado a campo e propagado <i>in vitro</i>	113
Tabela 17 -	Tempos de retenção e áreas relativas dos sinais observados nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 254 nm a partir de extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i>	116
Tabela 18 -	Tempos de retenção e áreas relativas dos sinais observados nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 480 nm a partir de extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i>	120
Tabela 19 -	Espectros de absorção UV indicativos de carotenoides, referentes aos sinais obtidos a partir das análises cromatográficas de extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i>	121
Tabela 20 -	Tempos de retenção e áreas relativas dos sinais observados nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 340 nm a partir de extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i>	124
Tabela 21 -	Espectros de absorção no UV indicativos de flavonoides, referentes aos sinais obtidos a partir das análises cromatográficas de extratos metanólicos de <i>C. spinosa</i>	125

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIB	Ácido indolbutírico
BAP	6-benzilaminopurina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EG	Etilenoglicol
EM	Espectrometria de Massas
ISSR	<i>Inter-simple sequence repeats</i>
MS	Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)
MS0	Meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) sem reguladores de crescimento
NL	Nitrogênio líquido
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIC	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PVS	<i>Plant Vitrification Solution</i>
PVS2	<i>Plant Vitrification Solution 2</i>
PVS3	<i>Plant Vitrification Solution 3</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
SCoT	<i>Start codon targeted polymorphism</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TAQ	<i>Termophylus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
U	Unidade
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Estratégias de conservação	19
1.2	Criopreservação	21
1.2.1	<u>Agentes crioprotetores e osmoproteção</u>	23
1.2.2	<u>Técnicas de criopreservação</u>	26
1.3	Avaliação da estabilidade genética dos materiais <i>in vitro</i>	30
1.4	Avaliação fitoquímica dos materiais <i>in vitro</i>	32
1.5	<i>Cleome spinosa</i> Jaqc.	35
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3	METODOLOGIA	42
3.1	Material botânico e condições de cultura	42
3.2	Criopreservação	43
3.2.1	<u>Preparo das crioplacas</u>	43
3.2.2	<u>Técnica de V-Crioplaca</u>	44
3.2.2.1	Reaquecimento recuperação.....	44
3.2.3	<u>Técnica de D-Crioplaca</u>	46
3.2.3.1	Etapa de pré-cultivo.....	46
3.2.3.2	Exposição ao <i>loading</i> e dessecação em sílica gel.....	46
3.2.3.3	Reaquecimento e recuperação.....	47
3.2.4	<u>Análise estatística</u>	48
3.3	Aclimatização	49
3.4	Análise da estabilidade genética	50
3.4.1	<u>Material vegetal</u>	50
3.4.2	<u>Extração e quantificação de DNA</u>	50
3.4.3	<u>Análise pela técnica SCoT (<i>Start Codon Targeted Polymorphism</i>)</u>	52
3.4.4	<u>Análise pela técnica de ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)</u>	52

3.4.5	<u>Análise dos produtos de amplificação gerados a partir das técnicas SCoT e ISSR</u>	53
3.5	Determinação do perfil fitoquímico	55
3.5.1	<u>Material vegetal</u>	55
3.5.2	<u>Preparo dos extratos</u>	55
3.5.3	<u>Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV)</u>	56
4	RESULTADOS	58
4.1	Criopreservação por V-Crioplaca	58
4.2	Criopreservação por D-Crioplaca	78
4.2.1	<u>Estabelecimento do pré-cultivo de ápices</u>	78
4.2.2	<u>Avaliação do tempo de exposição à sílica gel</u>	80
4.2.3	<u>Criopreservação e recuperação</u>	82
4.3	Aclimatização	94
4.3	Análise da estabilidade genética	96
4.3.1	<u>Extração e quantificação de DNA</u>	96
4.3.2	<u>Análise pela técnica SCoT (<i>Start Codon Targeted Polymorphism</i>)</u>	98
4.3.3	<u>Análise pela técnica ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)</u>	106
4.4	Determinação do perfil fitoquímico	113
4.4.1	<u>Rendimento dos extratos</u>	113
4.4.2	<u>Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV)</u>	114
5	DISCUSSÃO	126
	CONCLUSÕES	143
	PERSPECTIVAS	145
	REFERÊNCIAS	146
	APÊNDICE - Cryopreservation of <i>in vitro</i>-grown shoot tips of the medicinal species <i>Cleome spinosa</i> (Cleomaceae) applying vitrification-based techniques	160

INTRODUÇÃO

As plantas representam uma fonte significativa de substâncias bioativas que vêm sendo exploradas pela humanidade há séculos, tanto pela medicina popular, que tem sua base no uso empírico das plantas por comunidades tradicionais, como pela própria indústria farmacêutica. Em função deste interesse, muitas das chamadas plantas medicinais têm sofrido com o extrativismo. Esse fato reforça a importância no desenvolvimento de estratégias biotecnológicas visando à produção dessas espécies sob condições *in vitro* e, conseqüentemente, preservando as populações naturais das atividades extrativistas. Entre essas espécies encontra-se *Cleome spinosa* Jacq., que apresenta ampla distribuição mundial, sendo utilizada na medicina popular, como por exemplo, no combate a doenças do trato respiratório. A espécie vem sendo alvo de estudos no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ, já tendo sido estabelecidos sistemas *in vitro* visando à sua propagação e à produção de metabólitos. Entretanto, uma vez estabelecidos os materiais *in vitro*, torna-se de grande relevância o desenvolvimento de estratégias que permitam a conservação em longo prazo desse germoplasma de interesse, o que pode ser alcançado empregando as técnicas de criopreservação. Para que um protocolo de criopreservação seja efetivamente útil, fatores como a manutenção das características genéticas nos materiais *in vitro* e a manutenção da capacidade de síntese de metabólitos de interesse, são essenciais para o sucesso no desenvolvimento de estratégias que permitam a efetiva exploração comercial desses produtos. Dessa forma, em continuidade às pesquisas com *C. spinosa*, constituem o objeto do presente trabalho, estudos de conservação em longo prazo e monitoramento das estabilidades genética e fitoquímica dos materiais.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Estratégias de conservação

Os recursos genéticos vegetais representam uma fonte imensurável de variabilidade genética a ser aplicada direta ou indiretamente na obtenção de produtos ou serviços: uso terapêutico, fonte de alimentos, matéria-prima para a fabricação de materiais de uso doméstico e industrial, entre outros (KELLER et al., 2013). Entretanto, o aumento da população humana e a forma como suas atividades impactam o ambiente tem levado à degradação e fragmentação dos habitats naturais, gerando o desaparecimento de espécies e perda da biodiversidade (CRUZ-CRUZ et al., 2013). Assim, é notório a necessidade de se investir em esforços visando à conservação desses valiosos recursos genéticos.

As estratégias de conservação da biodiversidade envolvem métodos *in situ* e *ex situ*. As formas de conservação *in situ* são desenvolvidas sob condições naturais, mantendo a espécie como um componente do ecossistema natural do qual ela já faz parte. Por estar pautada na conservação do *habitat* natural, a conservação *in situ* inclui áreas naturais, sistemas agrícolas tradicionais e a criação e monitoramento de grandes áreas, as Unidades de Conservação (BRASIL, 2000; HASSLER, 2005). Entretanto, a manutenção desses recursos sob condições naturais necessita normalmente de extensas áreas e, muitas vezes, as espécies estão sob risco iminente de desaparecimento (CRUZ-CRUZ et al., 2013). Ainda há uma carência de órgãos governamentais e institucionais que assegurem o uso e manejo adequado das áreas para que as metas possam ser atingidas (HEYWOOD; DULLOO, 2005). Além disso, a conservação de uma espécie em um ou poucos locais de ocorrência não significa, necessariamente, a conservação de toda a sua variabilidade genética (MMA, 2000).

Como estratégia complementar à conservação *in situ*, destaca-se aquela desenvolvida *ex situ*. Esta consiste na manutenção do germoplasma vegetal fora do *habitat* natural (IUCN, 2002; MMA, 2000). A conservação *ex situ* compreende coleções de amostras da diversidade genética de procedências distintas em apenas um local, facilitando o melhoramento genético, garantindo a proteção à diversidade intraespecífica

e tendo a possibilidade de se preservar genótipos de interesse. Os métodos de conservação *ex situ*, em alguns casos, são as únicas estratégias possíveis para conservar certas espécies, sendo empregados principalmente para aquelas que apresentam propagação vegetativa, que estão sob ameaçadas de extinção, entre outros motivos. Além disso, a conservação *ex situ* permite a manutenção de amostras por um tempo prolongado, o que facilita a investigação sob o ponto de vista anatômico, fisiológico e bioquímico do material preservado (CRUZ-CRUZ et al., 2013).

A conservação *ex situ* pode ser desenvolvida através de bancos de sementes, coleções vivas ou utilizando abordagens biotecnológicas, como o cultivo *in vitro* e a criopreservação (JUNGHANS; SOUZA, 2009).

A manutenção do germoplasma vegetal *in vitro*, realizada com base em técnicas de cultura de tecidos vegetais, tem sido amplamente utilizada e apresenta diversas vantagens tais como o fornecimento de material vegetal sob condições assépticas e controladas em espaço reduzido e curto período de tempo, independentemente de variações climáticas e sazonais (BHOITE; PALSHIKAR, 2014; KUMAR; REDDY, 2011). Diferentes métodos de conservação *in vitro* podem ser empregados dependendo do objetivo e do tempo de armazenamento requeridos. A cultura de tecidos vegetais sob condições de crescimento ativo, crescimento lento e a criopreservação constituem as três principais ferramentas da conservação *in vitro*, que propiciam a manutenção do germoplasma viável a curto, médio e longo prazo, respectivamente, possibilitando seu acesso para o melhoramento vegetal (PENCE et al., 2002).

Na conservação em curto prazo, o material é submetido a subcultivos periódicos de modo que o processo de crescimento não é interrompido. A partir das plantas geradas, são obtidos explantes - pequenos fragmentos de tecidos ou órgãos vegetais retirados de uma planta doadora, denominada planta matriz - que podem ser utilizados para iniciar outras culturas. Para sua correta manutenção, os materiais vegetais são frequentemente transferidos para meios de cultura frescos. Os meios de cultivo compreendem formulações que contêm substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento do material cultivado *in vitro*, a saber: água, uma fonte de carboidrato, que geralmente é a sacarose, sais minerais e vitaminas (BHOITE; PALSHIKAR, 2014; ILIEV et al., 2010). Essas formulações podem ser manipuladas de acordo com as exigências nutricionais das plantas e suplementadas com reguladores de crescimento ou fitorreguladores, substâncias com ação fisiológica similar a dos fitormônios naturais. O balanço entre a classe e a concentração dos fitorreguladores visa induzir diferentes respostas fisiológicas, tais como

a proliferação celular (BHOITE; PALSHIKAR, 2014). Dessa forma, o crescimento constante de uma cultura *in vitro* é uma condição indispensável e um importante índice de eficiência da técnica de conservação utilizada.

Já a conservação em médio prazo baseia-se na redução da taxa de crescimento das culturas, permitindo o aumento do intervalo entre os subcultivos. Para tal, são utilizadas diversas estratégias: diminuição da temperatura de cultivo; alteração na disponibilidade de oxigênio e luminosidade; redução da concentração de sais minerais e açúcares no meio de cultura; assim como a manipulação de outras substâncias adicionadas ao meio, como alguns reguladores de crescimento, com destaque para o ácido abscísico (BELOKUROVA, 2010).

Entretanto, a manutenção das culturas tanto em crescimento ativo como lento, requer a realização de subcultivos, o que pode acarretar em contaminações, perda do potencial morfo genético e biossintético, assim como ocorrência de variações genéticas (BAIRU; AREMU; STADEN, 2011). Portanto, o estabelecimento de protocolos que permitam a conservação do material vegetal em longo prazo, sem a ocorrência de alterações fisiológicas ou bioquímicas, se mostra como uma alternativa eficiente para garantir a manutenção de germoplasmas de interesse.

1.2 Criopreservação

Nas últimas duas décadas, a criobiologia alcançou grande progresso com o desenvolvimento de diversos protocolos de conservação vegetal por meio da criopreservação para numerosas espécies vegetais de propagação vegetativa, assim como frutíferas, ornamentais, medicinais e produtos biotecnológicos (MATSUMOTO, 2017). A criopreservação é um método de armazenamento de material biológico a temperaturas ultrabaixas, utilizando-se nitrogênio líquido (-196°C) ou sua fase de vapor (-150°C) (BENSON, 2008). A essas temperaturas, todas as divisões celulares e os processos metabólicos são interrompidos, de maneira que o material vegetal pode permanecer armazenado sem alterações por um período de tempo, teoricamente, indeterminado e com riscos reduzidos de alterações genéticas (KALAISELVI; RAJASEKAR; GOMATHI, 2017). Portanto, esse método se tornou uma importante ferramenta para a conservação do germoplasma vegetal em longo prazo.

Além da redução de espaço para o armazenamento do material, a criopreservação possibilita diminuição das manutenções periódicas das culturas, assim como do risco de contaminação (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Uma outra vantagem da técnica é o menor custo em comparação com as coleções de germoplasma mantidas sob crescimento ativo e crescimento lento (LI; PRITCHARD, 2009).

O principal desafio da criopreservação é realizar o resfriamento da amostra evitando a formação de cristais de gelo no interior das células, sendo as temperaturas de -15 a -60°C as mais críticas, pois correspondem à faixa em que ocorre a nucleação, ou seja, a fase inicial do rearranjo cristalino para formação dos cristais de gelo. Durante o processo de criopreservação, o explante é submetido duas vezes a essa faixa de temperatura: a primeira durante o resfriamento e a segunda durante o reaquecimento. A formação dos cristais pode provocar a ruptura do sistema de membranas celulares, resultando na perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular, levando à morte celular (MATSUMOTO, 2017).

Para prevenir a formação de cristais de gelo, as técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente baseiam-se no processo de vitrificação: processo físico pelo qual as soluções celulares altamente concentradas e viscosas são resfriadas abaixo de sua temperatura de congelamento e atingem o estado vítreo (CRUZ-CRUZ et al., 2013). Este pode ser definido como o estado amorfo ou metaestável não cristalino de um sólido, ou seja, nele soluções supersaturadas e viscosas apresentam o arranjo molecular de um líquido, com propriedades físicas similares as de um sólido (COLLARES et al., 2002). Esse processo ocorre uma vez que a alta viscosidade restringe a mobilidade e a habilidade de as moléculas de água se rearranjarem em forma de cristais. O estado vítreo restringe também a difusão de outras substâncias dentro da célula, a alteração do pH, além de prevenir o colapso tecidual, garantindo um estado de quiescência metabólica (BENSON et al., 2006; GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

Para atingir o estado vítreo e assim evitar a formação de cristais, é necessário remover a maior quantidade possível da água livre das células, sem afetar o teor de água estrutural, antes da imersão em nitrogênio líquido. Assim, o conteúdo citosólico se torna altamente concentrado e viscoso, diminuindo a capacidade de rearranjo cristalino das moléculas de água durante a exposição a temperaturas abaixo daquela de congelamento (PANIS, 2019). Sendo assim, de um modo geral, os protocolos de criopreservação se desenvolvem em algumas etapas básicas: seleção do material, pré-cultivo, osmoproteção, desidratação, resfriamento em NL. Para fins de avaliação do protocolo e posterior

reutilização do material, pode-se empregar o reaquecimento, tratamento após conservação e avaliação da recuperação do material.

A escolha do material a ser criopreservado constitui uma etapa importante para o processo. Em geral, estruturas de tamanho reduzido são mais recomendadas devido à rapidez e uniformidade com que as etapas de desidratação, resfriamento e reaquecimento ocorrem (CARVALHO; VIDAL, 2003). Diversos materiais vegetais podem ser criopreservados (ápices caulinares, calos, embriões, gemas axilares, sementes e suspensões celulares, entre outros), porém as regiões meristemáticas são as mais indicadas. O sucesso dos protocolos de criopreservação utilizando regiões meristemáticas é associado a diversas características que conferem a estes materiais alto potencial de tolerância osmótica: tamanho reduzido, células com pequenos vacúolos e em constante divisão celular (ENGELMANN, 2011). Também é importante que haja uma padronização do material utilizado, uma vez que explantes localizados em diferentes posições no vegetal ou de diferentes idades apresentam condições fisiológicas distintas, tais como grau de maturação e níveis hormonais endógenos, podendo interferir no resultado da criopreservação (ENGELMANN, 2011; GEORGE; HALL; KLERK, 2008b).

1.2.1 Agentes crioprotetores e osmoproteção

A maioria dos materiais vegetais utilizados na criopreservação é pouco tolerante ao resfriamento devido ao elevado conteúdo hídrico intra e extracelular, o que os torna sensíveis à injúria pelo resfriamento (ENGELMANN, 2011). Desta forma, após ser selecionado, o material vegetal passa por uma série de etapas que visam sua desidratação artificial a qual pode ser alcançada pelo método evaporativo (dessecação em fluxo laminar ou pela exposição do material à sílica gel) ou osmótico (exposição do material a soluções crioprotetoras altamente concentradas) (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Independentemente do método empregado, a adição de um agente crioprotetor é fundamental, principalmente para espécies de clima tropical que são naturalmente sensíveis ao resfriamento.

Os crioprotetores são substâncias de classe orgânica variada que previnem possíveis danos causados pela desidratação e pelas etapas de resfriamento e

reaquecimento (ELLIOTT; WANG; FULLER, 2017; HAN et al., 2009). De um modo geral, eles atuam diminuindo o ponto de congelamento, protegendo a integridade das membranas e aumentando a viscosidade da solução celular (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2008).

Os primeiros estudos do uso de substâncias orgânicas com ação crioprotetora ocorreram na década de 1950, nos quais Polge e colaboradores (1949) empregaram o glicerol como agente crioprotetor durante as tentativas para preservar espermatozoides de aves. Na década seguinte, a ação positiva do dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetor, induzindo maior permeabilidade em vários tipos de células quando comparado ao glicerol, também foi descrita (LOVELOCK; BISHOP, 1959). Somente a partir da década de 1980, estudos já consideravam um possível efeito tóxico dos crioprotetores como um obstáculo para o sucesso da criobiologia (FAHY, 1986).

De acordo com suas características químicas, os crioprotetores podem apresentar diferentes graus de permeabilidade celular. Solventes orgânicos de baixo peso molecular possuem a capacidade de interagir com a porção polar dos fosfolipídeos de membrana e conseguem ultrapassá-la rapidamente (ELLIOTT; WANG; FULLER, 2017). Essas substâncias atuam substituindo parcialmente a água no interior da célula e ligam-se ao hidrogênio das moléculas de água intracelular, aumentando sua viscosidade e, conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelamento (JAIN; PAULSON, 2006). O DMSO, o etilenoglicol (EG), o propilenoglicol e o glicerol são exemplos desses crioprotetores. Destaca-se também a importância de alguns como agentes antioxidantes, tais como o DMSO (CASTRO et al., 2011). Já outros crioprotetores penetram nas células mais lentamente e induzem a desidratação devido ao aumento da osmolaridade do meio extracelular (BENSON, 2008). Como exemplo, pode-se citar a sacarose, a polivinilpirrolidona (PVP), o óxido de polietileno e o hidroxietilamido.

Entre os agentes crioprotetores citados anteriormente, o glicerol apresenta um comportamento peculiar, já que à temperatura ambiente, consegue penetrar através das membranas mais rapidamente do que quando utilizado a 0°C (CASTRO et al., 2011).

Os carboidratos são uma classe de biomoléculas muito utilizadas em protocolos de criopreservação independentemente da técnica empregada. A trealose, a glicose, o manitol, o sorbitol e, mais frequentemente, a sacarose são utilizados em altas concentrações em diferentes etapas da criopreservação, sobretudo durante o pré-cultivo dos explantes em meio de cultura altamente concentrado (HELLIOT, et al. 2003). O pré-tratamento com esses agentes crioprotetores simula respostas adaptativas naturais das

plantas de regiões de clima temperado que, devido à exposição gradual a baixas temperaturas, apresentam diversos mecanismos de tolerância ao resfriamento, tais como o acúmulo de solutos (WOLFE; BRYANT, 2001; YUANYUAN et al., 2009). Entretanto, para algumas espécies, a exposição direta a altas concentrações de sacarose pode resultar em efeitos deletérios para a sobrevivência ou desenvolvimento dos explantes. Para evitar estes efeitos, é indicado o uso de pré-cultivos com o aumento gradativo da concentração do açúcar (WANG et al., 2005).

A exposição do material vegetal a tratamentos que envolvem altas concentrações de agentes crioprotetores sem uma etapa de osmoproteção pode causar danos, em virtude do estresse osmótico. Tendo em vista o papel dos crioprotetores na indução de tolerância à desidratação nos protocolos de criopreservação, frequentemente se faz uso de uma solução de concentração intermediária antes da etapa de desidratação, a fim de minimizar tais danos (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008; PENNYCOOKE; TOWILL, 2001). Para tal, o uso da solução de *loading*, segundo NISHIZAWA et al., 1993 (2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose) vem sendo relatado como um importante fator para obter recuperação após o armazenamento em NL para diversas espécies (CANO-CASTILLO; CASAS, 2012; CHAEROENSUB; HIRAI; SAKAI, 2004; MATSUMOTO, 2002; VIDAL et al., 2005; WANG et al., 2002).

As substâncias crioprotetoras podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação, compondo as chamadas soluções de vitrificação. Diversas soluções crioprotetoras já foram estabelecidas, entre as quais, destacam-se as *Plant Vitrification Solutions* (PVS) que combinam substâncias de velocidades de penetração distintas e diferem entre si de acordo com o tipo e a concentração de cada componente (BENSON, 2008).

Dentre as PVS destaca-se a PVS2 (30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,4 M de sacarose), inicialmente descrita para a criopreservação de suspensões celulares de *Citrus sinensis* (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) e que vem sendo aplicada com sucesso na criopreservação de diversas espécies (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Volk e Walters (2006) estudaram o mecanismo de ação desta solução e indicaram sua atuação na substituição da água celular, modificando o comportamento de congelamento da água residual das células. Entretanto, o uso da PVS2 por extensos períodos pode ser letal, dependendo da espécie, sendo necessários estudos que visem à correlação precisa entre a taxa de desidratação e a toxicidade da solução de vitrificação.

Embora a maioria dos estudos utilize a PVS2, outras soluções de vitrificação também podem ser empregadas. Dentre elas, a PVS3 (50% de glicerol e 50% de sacarose), estabelecida originalmente para a criopreservação de suspensões celulares de *Asparagus officinalis* (NISHIZAWA et al., 1993). Por conter somente glicerol e sacarose, a PVS3 é considerada menos tóxica e, por isso, tem sido empregada como alternativa para a criopreservação de espécies sensíveis à PVS2 (KIM et al., 2009; SAKAI; ENGELMANN, 2007). Embora menos usuais, outras soluções de vitrificação também já foram desenvolvidas, tais como PVS1 (URAGAMI et al., 1989), PVS4 (SAKAI, 2000) e VSL (LIU; WANG; LIU, 2004).

Em geral, o tratamento com crioprotetores requer a utilização de elevadas concentrações, o que pode ser potencialmente tóxico para os materiais a serem criopreservados. Sendo assim, o seu uso deve levar em consideração o balanço entre o tipo de solução, a temperatura e tempo de exposição para que os explantes sejam suficientemente protegidos, sem que ocorra morte celular (WOLFE; BRYANT, 2001).

1.2.2. Técnicas de criopreservação

Diferentes técnicas de criopreservação são utilizadas para o armazenamento de germoplasma vegetal em Institutos de Pesquisa ao redor do mundo. Os primeiros protocolos de criopreservação vegetal começaram a ser desenvolvidos no século passado, durante a década de 1950, tendo como contribuição estudos que demonstraram os efeitos do resfriamento em plantas (PANIS, 2019).

A metodologia clássica baseia-se na desidratação induzida por congelamento. Para tal, o material é resfriado lentamente até uma temperatura definida (-40°C) a uma velocidade controlada (0,5 a 2°C/minuto), utilizando refrigeradores programáveis, com imersão em nitrogênio líquido na sequência (ENGELMANN, 2011). O resfriamento por meio da redução gradual da temperatura provoca a formação de gelo no meio extracelular que, devido à diferença de pressão de vapor, induz a saída da água intracelular e, conseqüentemente, o acúmulo de solutos dentro da célula (BENSON, 2008). Essas técnicas também utilizam substâncias crioprotetoras que atuam no incremento da viscosidade do citosol e na proteção da integridade das membranas (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2008). O aumento da viscosidade celular contribui para que o resfriamento

ocorra de forma mais rápida, evitando a formação de cristais de gelo no meio intracelular (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2011).

As metodologias de resfriamento lento são aplicadas com sucesso para sistemas de cultivo *in vitro* desorganizados, como culturas de calos e de células em suspensão (CRUZ-CRUZ et al., 2013). Entretanto, elas apresentam algumas limitações, principalmente para estruturas de tecidos complexos (ápices caulinares, gemas axilares e embriões, por exemplo) que, devido à sua composição celular variada, requerem condições muito específicas de desidratação induzida por congelamento (ENGELMANN, 2011). A técnica também apresenta baixa aplicabilidade para espécies tropicais, que não apresentam estratégias fisiológicas naturais de tolerância à redução da temperatura e, por isso, são mais suscetíveis ao dano por resfriamento (GERY et al., 2011).

A partir do final da década de 1980, foram iniciados estudos visando ao desenvolvimento de procedimentos que eliminassem a necessidade do resfriamento controlado. Sendo assim, diversas técnicas baseadas no processo de vitrificação foram desenvolvidas, o que contribuiu para um aumento considerável no número de espécies criopreservadas (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Essas técnicas são denominadas: dessecação, vitrificação (SAKAI et al., 1990); encapsulamento-desidratação (FABRE; DEREUDDRE, 1990); encapsulamento-vitrificação (MATSUMOTO et al., 1995), vitrificação em gotas (KARTHA; LEUNG; MROGINSKI, 1982; LEUNUFNA; KELLER, 2003), e vitrificação e dessecação utilizando Crioplacas de alumínio (YAMAMOTO et al., 2011; NIINO et al., 2013).

Na técnica de dessecação, a redução do conteúdo hídrico é alcançada através da exposição do material à desidratação evaporativa. Ao contrário das técnicas de desidratação osmótica, essa pode ou não ser precedida do pré-cultivo com meio enriquecido com açúcares (CRUZ-CRUZ et al., 2013). A dessecação é principalmente utilizada para a criopreservação de sementes e embriões somáticos e zigóticos (ENGELMANN, 2011).

Na técnica de vitrificação, o explante é submetido ao pré-cultivo, tratado ou não com solução de *loading* e, em seguida, é exposto à solução crioprotetora (a 0°C ou 25°C) antes da imersão em NL (ENGELMANN, 2011). Esta técnica é uma das mais utilizadas e vem sendo aplicada com sucesso a várias espécies vegetais, incluindo tropicais e subtropicais (MATSUMOTO, 2017). Contudo, tendo em vista o pequeno tamanho dos explantes utilizados, é necessário extremo cuidado com a manipulação durante o processo

para não danificar os materiais, assim como para garantir a precisão de tempo durante as etapas (ENGELMANN, 2011).

A associação das técnicas de dessecação e de vitrificação ao encapsulamento do material biológico em uma matriz de alginato de cálcio, resultou no estabelecimento das técnicas de encapsulamento-dessecação e encapsulamento-vitrificação.

No encapsulamento-dessecação, as cápsulas formadas devido a uma reação química de polimerização entre as soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio, são pré-tratadas com solução enriquecida com sacarose, em seguida, dessecadas em fluxo laminar ou sílica gel. A técnica vem sendo aplicada com sucesso para uma ampla gama de espécies e constitui uma alternativa simples e eficiente para superar os problemas associados à sensibilidade dos materiais vegetais às soluções de vitrificação (PANIS, 2019).

No encapsulamento-vitrificação, as cápsulas são expostas a soluções de vitrificação antes do resfriamento em NL. Além da proteção dos explantes, o encapsulamento torna a técnica de vitrificação mais prática uma vez que facilita a manipulação do material biológico. Comparando as duas técnicas que utilizam o encapsulamento, o uso deste procedimento com a vitrificação normalmente diminui o tempo gasto com os tratamentos de dessecação evaporativa necessários na técnica de encapsulamento-dessecação (PANIS, 2019; SAKAI; ENGELMANN, 2007).

A técnica de vitrificação em gotas foi desenvolvida por Kartha, Leung e Mroginski (1982) e modificada por Leunufna e Keller (2003). Nela, os explantes são submetidos a desidratação pela técnica de vitrificação e, em seguida dispostos individualmente em tiras de papel alumínio sendo cobertos por uma gota da solução de vitrificação antes da imersão em NL. O uso das folhas de alumínio e o pequeno volume de solução crioprotetora utilizado no momento do resfriamento possibilita atingir taxas de resfriamento/aquecimento muito elevadas. Esse método vem sendo aplicado com sucesso para a criopreservação de diversas espécies, dentre elas ápices caulinares de batata doce (PENNYCOOK; TOWILL, 2001), batata inglesa (KELLER; DREILING, 2002), inhame (LEUNUFNA; KELLER, 2003), banana (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005) e alho (KIM et al., 2009).

Tendo por base o princípio da vitrificação em gotas, recentemente foi desenvolvida uma nova técnica de criopreservação utilizando placas de alumínio (Crioplacas) em associação às técnicas de vitrificação (V-Crioplaca) (YAMAMOTO et al., 2011) ou dessecação (D-Crioplaca) (NIINO et al., 2013).

Essas técnicas consistem na aderência do material vegetal pré-cultivado em placas de alumínio empregando-se a mesma metodologia utilizada para o preparo das cápsulas de alginato de cálcio. Uma vez realizada a fixação do material biológico às Crioplacas, estas são submetidas aos tratamentos com solução osmoprotetora (*loading*), desidratação evaporativa ou osmótica, imersão em NL e reaquecimento direto em solução de *unloading*. Enquanto a técnica de V-Crioplaca baseia-se na desidratação osmótica, a técnica de D-Crioplaca é baseada em desidratação física (YAMAMOTO et al., 2011; NIINO et al., 2013).

Para ambas as técnicas, durante todo o processo de criopreservação, o material vegetal permanece aderido às Crioplacas, o que facilita a manipulação, diminui o risco de ocorrência de lesões ou perda de material ao longo do processo. A aderência à Crioplaca confere maior rapidez, praticidade e precisão entre as etapas, assim como garante que todos os explantes estejam em contato direto com as soluções utilizadas (YAMAMOTO et al., 2011). Além disso, o uso de um pequeno volume de solução crioprotetora (V-Crioplaca) associado ao caráter metálico das Crioplacas permite que sejam alcançadas taxas de resfriamento e reaquecimento extremamente rápidas ($4000\text{-}5000^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e $3000\text{-}4500^{\circ}\text{C min}^{-1}$, respectivamente). A alta taxa de transferência de calor das Crioplacas dificulta a formação de cristais de gelo no interior das células, minimizando as injúrias aos tecidos e favorecendo a recuperação do material criopreservado (YAMAMOTO et al., 2011).

O método de V-Crioplaca já foi relatado com sucesso para diversas espécies vegetais, tais como *Cleome rosea* (CORDEIRO et al., 2015), *Clinopodium odorum* (ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015), cultivares de *Fragaria* spp. (YAMAMOTO et al., 2012b), *Dianthus caryophyllus* (SEKIZAWA et al., 2011), *Juncus decipiens* (NIINO et al., 2013), *Mentha* spp. (YAMAMOTO et al., 2012a), *Morus* spp. (YAMAMOTO et al., 2012c), *Passiflora pohlii* (SIMÃO et al., 2017), *Passiflora suberosa* (VIANNA et al., 2019), *Perilla frutescens* (MATSUMOTO et al., 2014), *Petiveria alliacea* (PETTINELLI et al., 2017), *Tanacetum cinerariifolium* (YAMAMOTO et al., 2011), *Vaccinium* spp. (MATSUMOTO et al., 2015a) e *Saccharum officinarum* (RAFIQUE et al., 2015). Da mesma forma, a eficiência da técnica de D-Crioplaca já foi reportada para *Diospyros kaki* (MATSUMOTO et al., 2015b), *Juncus decipiens* (NIINO et al., 2013; 2014), *Phoenix dactylifera* (SALMA et al., 2014), *Solanum tuberosum* (YAMAMOTO et al., 2015), *Vaccinium* spp. (DHUNGANA et al., 2017).

Com o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas técnicas, a criopreservação tornou-se uma ferramenta importante para o armazenamento em longo prazo de germoplasmas de interesse, possibilitando a conservação de um maior número e variedade de espécies. Contudo, é fundamental que os materiais submetidos ao processo mantenham integridade genética, bioquímica e fisiológica (NIAZIAN, 2019). Dessa forma, é necessário se certificar de que os protocolos de criopreservação selecionados não estão causando danos que podem ser revelados como alterações morfológicas, fitoquímicas, cromossômicas, de expressão gênica, de perfil proteico ou de sequência de DNA (HARDING, 2004). Para isso é essencial que sejam realizadas avaliações para verificação da manutenção da estabilidade genética e, principalmente quando se trabalha com plantas medicinais, a manutenção da capacidade de produção das substâncias bioativas.

1.3 Avaliação da estabilidade genética dos materiais *in vitro*

Os procedimentos de criopreservação envolvem a exposição de explantes a diversos tratamentos indutores de estresse fisiológico, tais como o pré-cultivo com elevadas concentrações de sacarose; desidratação excessiva; tratamento com substâncias potencialmente tóxicas, como alguns crioprotetores; condições físicas extremas, como a temperatura ultrabaixa; assim como as etapas de cultivo *in vitro* (GANTAIT et al., 2015). Tais procedimentos podem ocasionar danos devido ao estresse oxidativo, aumentando a formação de radicais livres, os quais podem se ligar ao DNA e ocasionar, dentre outras, modificações no padrão de bases nitrogenadas, podendo resultar na alteração da expressão gênica (ANTONY et al., 2012; BENSON; BREMNER, 2004).

A possibilidade de alterações genéticas em plantas oriundas do processo de criopreservação tem sido uma grande preocupação para os pesquisadores, uma vez que a conservação de germoplasma vegetal requer a manutenção da estabilidade genética do material (MATSUMOTO, 2017). Sendo assim, a eficiência dos protocolos de criopreservação não está restrita somente em atingir um teor de umidade adequado para garantir a integridade do material durante o processo. Ela depende também da recuperação do material sem que haja variações genéticas (ENGELMANN, 2011).

O monitoramento da estabilidade genética constitui uma importante etapa para avaliar a eficácia de protocolos de criopreservação, podendo ser realizado através do uso

de marcadores (KAVIANI, 2011). O marcador genético é uma sequência de DNA com uma localização cromossômica conhecida que controla uma determinada característica. Os marcadores genéticos podem ser agrupados em duas categorias: marcadores clássicos (morfológicos, citológicos e bioquímicos) e marcadores moleculares (NADEEM et al., 2018).

Os marcadores morfológicos permitem distinguir visivelmente informações qualitativas, tais como alterações estruturais, no padrão de coloração, no hábito de crescimento, entre outras. Os marcadores citológicos relacionam-se com variações presentes no número e padrão de bandas, assim como o tamanho, forma, ordem e posição dos cromossomos. Já os marcadores bioquímicos (ou isoenzimas) são formas multi-moleculares de enzimas que são codificadas por vários genes, porém apresentam as mesmas funções (NADEEM et al., 2018).

Os marcadores moleculares compreendem sequências de DNA facilmente detectadas e monitoradas no genoma através de polimorfismos presente entre as sequências nucleotídicas de diferentes indivíduos (KUMAR et al., 2009). Tais polimorfismos podem ser resultado de mutações pontuais, tais como inserção, deleção e translocação, podendo ou não afetar a atividade de genes (NADEEM et al., 2018). Marcadores moleculares oferecem numerosas vantagens sobre os clássicos uma vez que são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independentemente do estágio de crescimento, diferenciação, desenvolvimento e efeitos epistáticos (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

É desejável que as técnicas baseadas em marcadores moleculares obedeçam alguns critérios, tais como: seja de fácil acesso; distribuído uniformemente por todo o genoma; apresente alta reprodutibilidade; capacidade de detectar níveis mais altos de polimorfismo; simples, rápido e barato, entre outros. Entretanto, nenhuma técnica é ideal para todas as situações e muitas vezes, pode-se utilizar tais técnicas isoladamente ou em conjunto para garantir maior robustez (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

A detecção e análise de variações genéticas pode ser efetuada por meio de diferentes técnicas. Em decorrência do surgimento da tecnologia da amplificação da molécula de DNA por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), houve um aumento significativo no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas baseadas em marcadores moleculares (FALEIRO, 2007). Como exemplos, pode-se citar: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), RAPD

(*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e suas variações (por exemplo, ISSR - *Inter-Simple Sequence Repeats*), SCoT (*Start Codon Targeted Polymorphism*), entre outros.

A técnica de ISSR (ZIETKIEWICZ et al., 1994) baseia-se na amplificação enzimática de segmentos de DNA a partir de iniciadores (*primers*) com cerca de 100-3000 pares de base, complementares a regiões de microssatélites ou SSR (regiões curtas do genoma cuja sequência de nucleotídeos se repete várias vezes) e orientadas de forma oposta (NG; TAN, 2015). Nesta técnica, iniciadores baseados em microssatélites são utilizados para amplificar sequências de DNA inter-SSR via PCR. Os produtos da amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose, corados e visualizados em luz UV. Os marcadores ISSR são do tipo dominante, não necessitam de dados de sequência prévia para construção de *primers* e, como os procedimentos analíticos incluem PCR, requerem pequenas quantidades de DNA.

O SCoT (COLLARD; MACKILL 2009) é uma técnica de marcador de DNA baseada em regiões conservadas que flanqueiam o códon de iniciação da tradução ATG em genes de plantas. Nesta técnica, a amplificação do DNA é realizada via PCR usando *primers* simples com 18 bases os quais são utilizados como iniciador direto e reverso, semelhante ao ISSR. A técnica vem sendo utilizada com sucesso para diversos fins como alternativa a outros marcadores e sua reprodutibilidade normalmente está associada a estrutura do *primer* e sua temperatura de anelamento, que pode variar de acordo com o percentual de bases citosinas e guaninas presentes no oligonucleotídeo. Os fragmentos gerados são separados por eletroforese em gel de agarose, corados e visualizados em luz UV (COLLARD; MACKILL 2009).

1.4 Avaliação fitoquímica dos materiais *in vitro*

Ao longo dos anos, várias espécies vegetais têm sido utilizadas em diversos setores devido à presença de metabólitos secundários de interesse. Entretanto, poucas já foram investigadas sob o ponto de vista químico. Nesse sentido, insere-se a pesquisa fitoquímica a qual tem como objetivo conhecer as substâncias químicas das espécies vegetais e avaliar sua presença e bioatividade, identificando grupos de metabólitos relevantes (SIMÕES et al., 2004). Embora a criopreservação seja uma importante

estratégia para a conservação de recursos genéticos, ainda existem poucos estudos que investiguem a capacidade de manutenção da produção de substâncias bioativas em plantas regeneradas após o processo (BI et al., 2016; MARCO-MEDINA; CASAS, 2013). As substâncias bioativas, geralmente são produtos do metabolismo secundário (ou especial) vegetal. Este, diferentemente do metabolismo primário, é restrito a certas espécies ou grupos taxonômicos e não se relaciona diretamente ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Porém, conferem ao organismo produtor respostas adaptativas e de sobrevivência a estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os metabólitos secundários são moléculas de baixo peso molecular, normalmente produzidas em pequenas quantidades, e apresentam grande complexidade estrutural e funcional (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013). Essas moléculas representam uma importante interface entre a planta e o ambiente de modo que sua síntese pode ser modulada por diferentes condições ambientais: sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, aporte nutricional, poluição atmosférica, altitude, ataque de patógenos (GANDHI; MAHAJAN; BEDI, 2015). Dessa forma, sua ocorrência é muito variável, podendo ser encontradas em diferentes órgãos ou estar armazenadas em estruturas específicas, sendo sua síntese, muitas vezes, restrita à determinada fase da vida do vegetal (ISAH et al., 2018).

Segundo Hussain e colaboradores (2012), os metabólitos secundários podem ser classificados em três principais grupos de acordo com suas características químicas: terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas.

Os terpenoides (terpenos e seus derivados) ocorrem em todos os vegetais e constituem o maior grupo de metabólitos secundários, com cerca de 22 mil substâncias descritas. Constituem um grupo de hidrocarbonetos formados a partir da união de unidades isoprênicas (C_5H_8), podendo ser subdivididos em algumas subclasses de acordo com o número dessas unidades. Um exemplo de substâncias pertencentes a essa classe são os carotenoides que são terpenos formados normalmente por 40 átomos de carbono e repletos de ligações insaturadas. Normalmente substâncias pertencentes a essa classe conferem vantagens defensivas às plantas devido à sua toxicidade para diversos animais, auxiliam na atração de polinizadores e/ou atuam como agentes antioxidantes (TAIZ; ZEIGER, 2013).

As substâncias fenólicas apresentam uma grande diversidade estrutural e são caracterizadas pela presença de dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três átomos de carbonos. Dependendo das modificações do anel central, os flavonoides podem

ser subdivididos em diferentes subclasses, como flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas e proantocianidinas (UZEL et al., 2005). Os flavonoides são um grupo muito diverso e apresentam um importante papel na defesa vegetal contra pragas e doenças, além de fatores abióticos contra excesso de radiação UV. Substâncias desta classe de metabólitos apresentam grande interesse econômico em função de suas propriedades farmacológicas, como antitumoral, antioxidante, antiviral, dentre outras (SYTAR et al., 2012).

As substâncias nitrogenadas, grupo de metabólitos sintetizados a partir de aminoácidos, apresentam pelo menos um átomo de nitrogênio em sua composição. Atuam na atração de dispersores, polinizadores e também com função de defesa contra herbívoros. Essas substâncias têm sido avaliadas quanto às suas propriedades medicinais e muitos estudos mostram seu efeito positivo sobre diversas linhagens tumorais (BECKER; JUVIK, 2016).

Tendo em vista a grande diversidade química presente nos vegetais, torna-se relevante o investimento em estudos visando a identificação de sua composição e o isolamento de substâncias de interesse presentes nos extratos vegetais. Para tal, podem ser utilizadas técnicas cromatográficas que compreendem métodos físico-químicos de separação dos componentes de uma mistura. Os sistemas cromatográficos são compostos por duas fases imiscíveis: a fase estacionária (líquida ou sólida) e a móvel (líquida ou gasosa). Enquanto a primeira permanece imóvel, a última se move através dela, em uma coluna ou em superfície plana. A separação da mistura ocorre devido a migração diferencial de seus componentes em função da interação destes com as duas fases que compõem o sistema (COLLINS, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) fundamenta-se na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis: a fase móvel líquida, sob alta pressão, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica. Dependendo do tipo de fase estacionária utilizada, as separações podem ser alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas. A grande variação de fases estacionárias torna a CLAE uma técnica bastante versátil, por possibilitar análises e separações de uma ampla gama de substâncias com alta eficiência (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os detectores mais comuns em CLAE são os espectrofotométricos (UV/Vis), aplicados para detectar compostos com grupamento cromóforo. Essa técnica utiliza equipamentos totalmente automatizados e tem a capacidade de realizar separações, análises qualitativas e quantitativas de uma grande

variedade de substâncias presentes em amostras preferencialmente não-voláteis e termolábeis de forma rápida e com alta resolução e detectabilidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; JARDIM et al., 2006).

1.5 *Cleome spinosa* Jacq.

O gênero *Cleome* L. é o de maior representatividade da família Cleomaceae, compreendendo cerca de 200 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da África, América e Oceania (APARADH; MAHAMUNI; KARADGE, 2012; VOZNESENSKAYA et al., 2018). Somente na região tropical, são encontradas 150 espécies do gênero, sendo 30 ocorrentes no Brasil (PEREIRA et al., 2007).

Por muito tempo, estudos baseados na biologia floral, inseriam o gênero *Cleome* na família Capparaceae (HOOKER; THOMSON, 1872; COOKE, 1903). Entretanto, dados de filogenética molecular permitiram a separação taxonômica do gênero e sua inclusão em uma nova família, denominada Cleomaceae (ILTIS et al., 2011; HALL et al., 2002).

Cleome spinosa Jacq., conhecida pelos nomes populares de mussambê-de-espinho, sete-marias ou beijo-fedorento, apresenta distribuição na África, Ásia e América tropical, sendo encontrada de norte a sul do Brasil (COSTA-E-SILVA, 2000). A espécie geralmente habita margens de rios ou áreas urbanas, que estão sujeitas a intenso impacto antrópico, o que pode levar ao desaparecimento de algumas populações (ALBARELLO et al., 2006; COSTA-E-SILVA, 2000).

Cleome spinosa possui hábito subarbustivo (Figura 1a), podendo atingir até dois metros e meio de altura. Apresenta folhas compostas, alternas e pecioladas com estípulas espinescentes. Os folíolos são elípticos, com margem ciliada, ápice acuminado e base atenuada (COSTA-E-SILVA, 2000). Tanto o caule como as folhas apresentam tricomas glandulares, que lhes conferem um odor característico.

Suas inflorescências são terminais, racemosas do tipo corimbo e de coloração branca. As flores são zigomórficas, hermafroditas, a antese é crepuscular e elas não se abrem ao mesmo tempo nas inflorescências (floração assincrônica). Essas características associadas ao odor típico das flores e à produção abundante de néctar e pólen, constituem

importantes mecanismos de atração para polinizadores, como morcegos, mariposas e abelhas (PEREIRA et al., 2007).

Os frutos são simples e secos, do tipo síliqua, capsular, bicarpelar com deiscência longitudinal e de coloração verde ou bege (maduros). Cada um contém cerca de 130 sementes com comprimento médio de 1,5 mm (CASTRO et al., 2014). A propagação se dá por semente, porém a germinação requer um longo tempo e temperatura específica, sendo alcançadas baixas taxas de germinação (QUIN et al., 2012).

Assim como outras espécies do gênero, *C. spinosa* apresenta um importante valor ornamental devido a suas belas inflorescências (Figura 1b) e por este motivo é frequentemente cultivada em jardins (COSTA-E-SILVA, 2000).

Figura 1 - Aspectos morfológicos de *Cleome spinosa*.



Legenda: *Habitus* subarborescente (a); Detalhe da inflorescência (b).
Fotos: Thiago Barboza, 2013.

Na medicina tradicional, as folhas de *C. spinosa* são utilizadas na forma de infusão no combate à febre, gripe, tosse, bronquite, asma (AGRA et al. 2007) e como estimulante do aparelho digestório (LEAL, 2007). Quando maceradas, apresentam ação rubefaciente ao serem aplicadas sobre a pele (LEAL, 2007). Suas folhas também são eficazes no combate à inflamação de garganta (CONCEIÇÃO et al., 2011), otites supuradas e leucorreia (LEAL, 2007). As raízes são eficientes no tratamento de bronquites asmáticas (COLLINS et al., 2004). Além disso, a planta inteira apresenta ação digestiva e cicatrizante (CABRAL; AGRA, 1998; AGRA et al., 2007).

A análise fitoquímica de extratos hidroalcoólicos da parte aérea revelou a presença de alcaloides, flavonoides, xantonas, saponinas e leucoantocianidinas (LEAL et al., 2007). Também foram isolados de partes aéreas, flavonas e diterpenos do tipo cembrano (COLLINS et al., 2004). Já a avaliação química das sementes levou à identificação e ao isolamento de substâncias pertencentes ao grupo dos glicosinolatos (AHMED et al., 1972), metabólitos secundários relacionados à atividade antineoplásica e importantes agentes inseticidas. A avaliação de extratos etanólicos de raízes e flores de *C. spinosa* indicou atividade antimicrobiana e importante atividade larvicida frente a larvas de *Aedes aegypti* (SANTOS; MENEZES, 2005). Ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados com extratos hidroalcoólicos preparados a partir de raízes revelaram o potencial antihelmintico da espécie (ANDRADE et al., 2014). Estudos com extratos de caule, folhas, flores e frutos revelaram um alto teor de aminoácidos sulfurados, principalmente a cisteína, um dos componentes da queratina. Dessa forma, o extrato da planta é capaz de ajudar na reconstrução da queratina e no crescimento da haste do cabelo, sendo utilizada como matriz para a indústria de cosméticos relacionados com o crescimento capilar (BELLE; BELAUBRE, 2011). Além disso, a análise dos óleos essenciais demonstrou ação antioxidante, inseticida e antimicrobiana (MCNEIL et al., 2010).

Tendo em vista os potenciais medicinal e ornamental de *C. spinosa*, além da vulnerabilidade dos seus locais de ocorrência e da dificuldade de germinação, diversas metodologias biotecnológicas vêm sendo aplicadas à espécie no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), pertencente ao Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

A micropropagação da espécie foi estabelecida a partir do cultivo de explantes hipocotiledonares e epicotiledonares (segmentos nodais e internodais) em meio de cultura suplementado com diferentes reguladores de crescimento (ALBARELLO et al., 2006) (Figura 2a e 2b). A partir de segmentos caulinares de plantas propagadas *in vitro* foram estabelecidos protocolos de calogênese, com a indução de linhagens celulares produtoras (Figura 2c) e não-produtoras (Figura 2d) de β -caroteno (ALBARELLO et al., 2007), além do estabelecimento de culturas de células em suspensão (ALBARELLO, 2005) (Figura 2e). Também já foram realizados estudos visando a germinação *in vitro* com a espécie (CASTRO et al., 2014) (Figura 2f). A partir de plantas germinadas *in vitro*, foi estabelecida a multiplicação de raízes de forma eficiente utilizando segmentos radiculares cultivados em meio enriquecido com auxinas (MORAES, 2015) (Figura 2g). Os estudos biotecnológicos foram associados a estudos farmacológicos através da avaliação do

potencial medicinal de extratos oriundos de plantas propagadas *in vivo* e culturas de calos, em comparação com extratos obtidos a partir de material coletado a campo. Esses estudos revelaram resultados positivos para atividades anti-inflamatória e analgésica (ALBARELLO et al., 2013).

Considerando os resultados positivos alcançados com a espécie no estabelecimento de protocolos *in vitro*, foram iniciados estudos de conservação em longo prazo por meio da criopreservação de plantas propagadas e mantidas *in vitro*, visando à manutenção do seu potencial morfogênico (VILARDO, 2015).

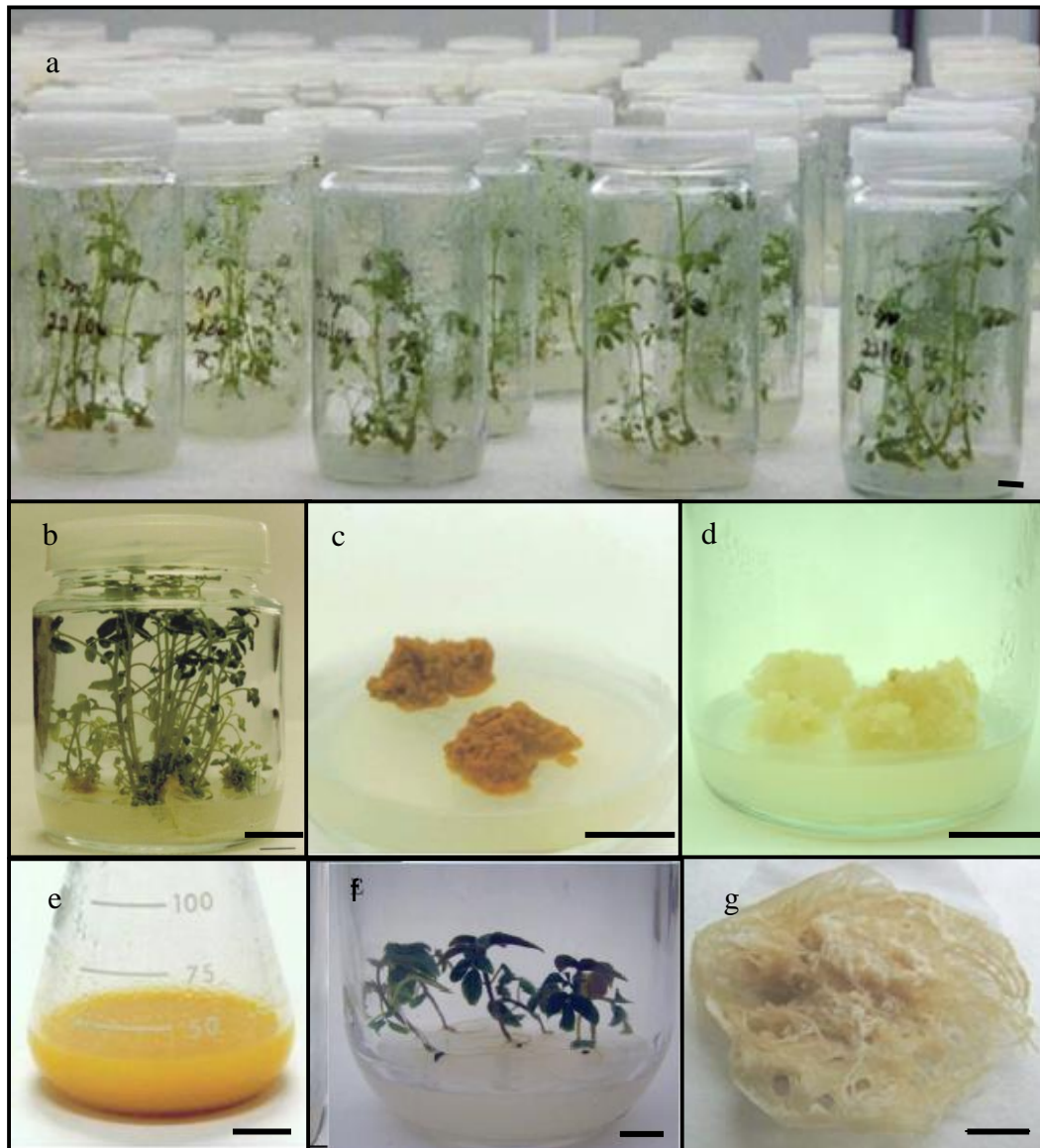
A avaliação prévia dos materiais vegetais de *C. spinosa* produzidos *in vitro* revelou que os mais indicados para a criopreservação foram os ápices caulinares uma vez que apresentaram capacidade de regeneração superior a segmentos nodais e caulinares. A exposição de ápices caulinares a diferentes concentrações de sacarose permitiu selecionar as melhores condições de pré-cultivo (0,3M por 24 h ou 0,25M - 0,5M de sacarose por 48h) nas quais o teor hídrico dos materiais foi reduzido sem perda da capacidade de regeneração. Nesses primeiros estudos, foram empregadas as técnicas de Vitrificação e de V-Crioplaca utilizando as soluções crioprotetoras, PVS2 e PVS3.

Os resultados demonstraram que, empregando a técnica de Vitrificação foram alcançados 26% de recuperação do material. Por outro lado, o emprego da metodologia de V-Crioplaca, aumentou em quase três vezes a recuperação dos ápices criopreservados (VILARDO, 2015) (Figura 3a-3c).

Diante dos resultados positivos alcançados nos primeiros estudos de criopreservação com *C. spinosa*, o presente trabalho visou dar continuidade a esta linha de pesquisa com a espécie. Foram avaliadas novas condições para a etapa de recuperação após a criopreservação empregando a técnica de V-Crioplaca, além de serem estabelecidos protocolos de criopreservação pela técnica de D-Crioplaca.

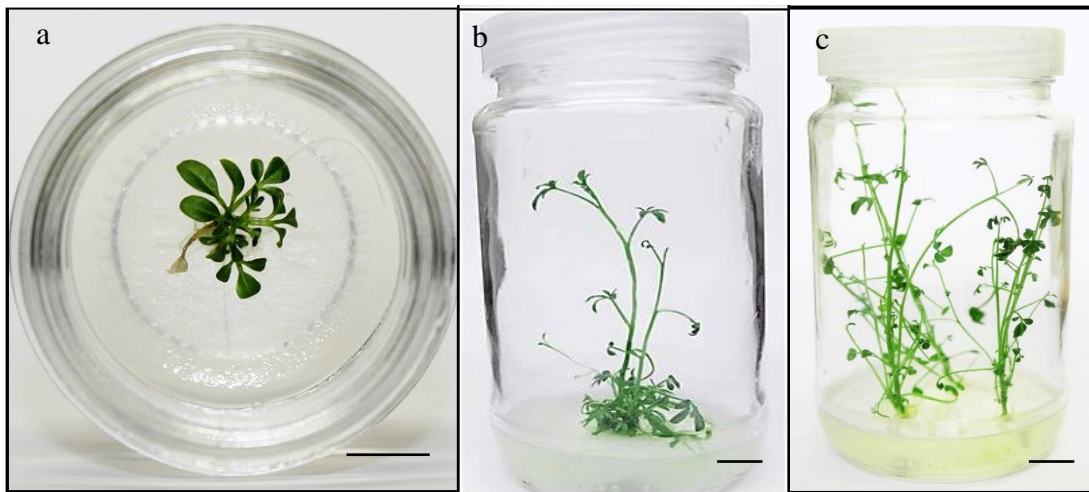
O trabalho também avaliou a manutenção das características morfológicas da espécie por meio da aclimatização das plantas oriundas do processo de criopreservação, assim como as estabilidades genética e fitoquímica desses materiais, pelo uso de técnicas de marcadores moleculares e análises cromatográficas, respectivamente. Esses estudos permitirão assegurar a qualidade do material para uso em estudos fitoquímicos e farmacológicos.

Figura 2 - Cultivo *in vitro* de *C. spinosa*: estudos realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN/NBV/UERJ).



Legenda: Plantas propagadas *in vitro* mantidas em estoque em meio MS0 (a); Proliferação de brotos em culturas mantidas em meio MS + 1,0 mg.L⁻¹ BA + 0,1 mg.L⁻¹ AIA (b); Calos produtores de carotenoides produzidos em MS + 1.0 mg.L⁻¹ 2,4-D (c); Calos friáveis produzidos em meio MS + 0.1 mg.L⁻¹ PIC (d); Culturas de células em suspensão iniciadas a partir dos calos produtores de carotenoides (e); Germinação *in vitro* (f); Cultura de raízes obtidas a partir de explantes radiculares de plantas propagadas *in vitro* mantidos em meio MS + 3,0 mg.L⁻¹ IBA (g). Barras = 1 cm. Fotos: Acervo fotográfico do Labplan.

Figura 3 - Estudos de criopreservação com *C. spinosa* através da técnica de V-Crioplaca.



Legenda: Resposta regenerativa após a criopreservação nos períodos de um mês (a); dois meses (b); seis meses (c). Barras = 1 cm.

Fotos: Anna Flávia Vilardo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Criopreservar ápices caulinares de plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* utilizando as técnicas de V-Crioplaca e D-Crioplaca e realizar os monitoramentos genético e fitoquímico dos materiais criopreservados.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição ao fitorregulador BAP durante a etapa de recuperação dos ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca;
- ✓ Investigar a influência da temperatura e tempos de exposição à PVS2, em associação com as condições de recuperação avaliadas para a técnica de V-Crioplaca;
- ✓ Investigar o uso de alta concentração de sacarose no pré-tratamento e na solução de polimerização para a técnica de D-Crioplaca;
- ✓ Avaliar o efeito do tempo de exposição e da concentração de sacarose na solução de *loading* na criopreservação por D-Crioplaca;
- ✓ Determinar o efeito do tempo de dessecação em sílica gel e da suplementação com BAP na recuperação dos materiais criopreservados pela técnica de D-Crioplaca;
- ✓ Realizar a aclimatização das plantas recuperadas após a criopreservação para a técnica de V-Crioplaca;
- ✓ Realizar a análise da estabilidade genética das plantas recuperadas após a criopreservação utilizando os marcadores moleculares SCoT e ISSR;
- ✓ Comparar o perfil fitoquímico das plantas recuperadas em relação às plantas mantidas *in vitro* e cultivadas *in vivo* empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

3. METODOLOGIA

3.1 Material botânico e condições de cultura

Como fonte de material biológico, foram utilizadas plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* estabelecidas em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (ALBARELLO et al., 2006). Um exemplar representativo da espécie encontra-se depositado no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob registro HRJ 7639.

O estoque de plantas tem sido mantido por meio de subcultivos mensais, a partir da inoculação de segmentos caulinares (2-3 cm), providos da região apical, em frascos de cultura (12 x 5 cm) contendo 30 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem suplementação hormonal (MS0), enriquecido com 0,09 M de sacarose e solidificado com 8 g.L^{-1} de ágar. O pH dos meios de cultura é ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C por 15 min). As culturas são mantidas em câmara de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, sob fotoperíodo de 16 horas.

A partir das plantas em estoque foram preparadas microestacas (1 cm), contendo pelo menos uma região nodal (Figura 4a), as quais foram inoculadas em frascos de cultura (9 x 5,5 cm) com meio MS0 (4 microestacas/frasco). Após 2-3 semanas em cultivo, os ápices caulinares (1,5 mm) foram excisados e utilizados nos ensaios de criopreservação (Figura 4b).

3.2 Criopreservação

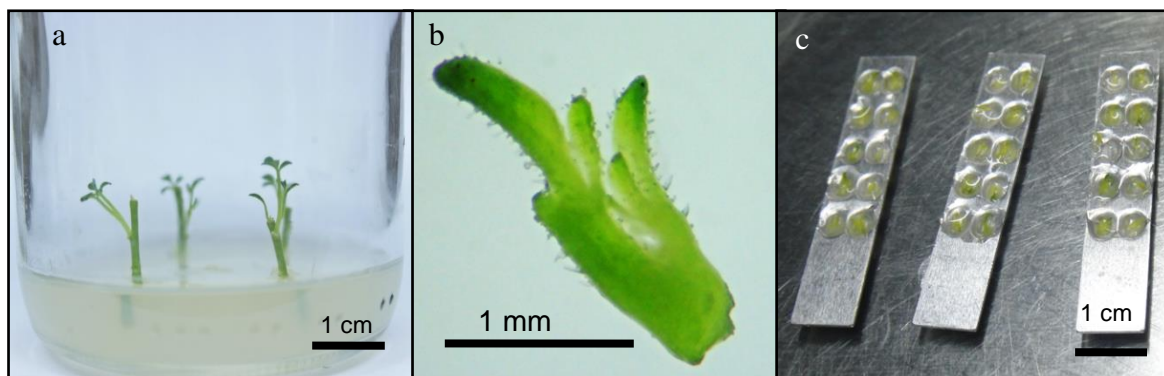
Os experimentos de criopreservação foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan) pertencente ao Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) da UERJ.

3.2.1 Preparo das Crioplacas

Os ápices caulinares excisados das microestacas foram aderidos a Crioplacas de alumínio (7 mm largura x 37 mm comprimento x 0.5 mm espessura), contendo 10 poços (Figura 4c) seguindo a metodologia estabelecida por Yamamoto e colaboradores (2011). As Crioplacas utilizadas no presente estudo foram cedidas pelos pesquisadores Dr. Florent Engelmann (IRD/ França) e Dr. Takao Niino (NIAS/Japão).

Uma gota (2 μ L) de solução de alginato de sódio (3%) foi distribuída em cada poço da Crioplaca com o auxílio de uma pipeta. A seguir, os ápices foram depositados sobre a solução de alginato e o volume do poço foi completado com mais uma gota da solução. Em seguida, foi gotejada solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) ao longo da superfície das Crioplacas, permanecendo por 15 minutos até a completa polimerização. O excesso da solução de CaCl_2 foi removido com o auxílio de uma pipeta e as Crioplacas foram secas em papel de filtro (Whatman n°1).

Figura 4 - Ápices caulinares de *C. spinosa* utilizados na criopreservação.



Legenda: Microestacas *in vitro* em meio MS0 (a); Explante isolado (b); Ápices aderidos às Crioplacas (c). Barras = 1cm. Fotos: Anna Flávia Vilardo, 2014.

3.2.2 Técnica de V-Crioplaca

Baseando-se nos primeiros estudos de criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* pela técnica de V-Crioplaca (VILARDO, 2015), foram avaliados novos fatores, visando otimizar a recuperação dos ápices criopreservados.

Ápices caulinares pré-cultivados em 25 mL de meio MS contendo concentrações crescentes de sacarose (0,25 M - 0,5 M), permanecendo 24h em cada concentração, foram aderidos à Crioplaca de alumínio. Em seguida, as Crioplacas foram transferidas para criotubos contendo 2 mL da solução de *loading* (2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose), preparada em meio MS, permanecendo em contato com a solução por 20 min à temperatura ambiente.

Logo após a exposição ao *loading*, o material foi exposto a 2 mL da solução de vitrificação PVS2 (30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,4 M de sacarose), preparada em meio MS. O material permaneceu imerso na solução por diferentes períodos de tempo (15, 30, 45, 60 e 90 min), em temperatura ambiente (25 °C) ou 0 °C.

As Crioplacas foram transferidas para criotubos completamente preenchidos por nitrogênio líquido (NL), sendo mantidas nesta condição por cerca de 15 min.

3.2.2.1 Reaquecimento e recuperação

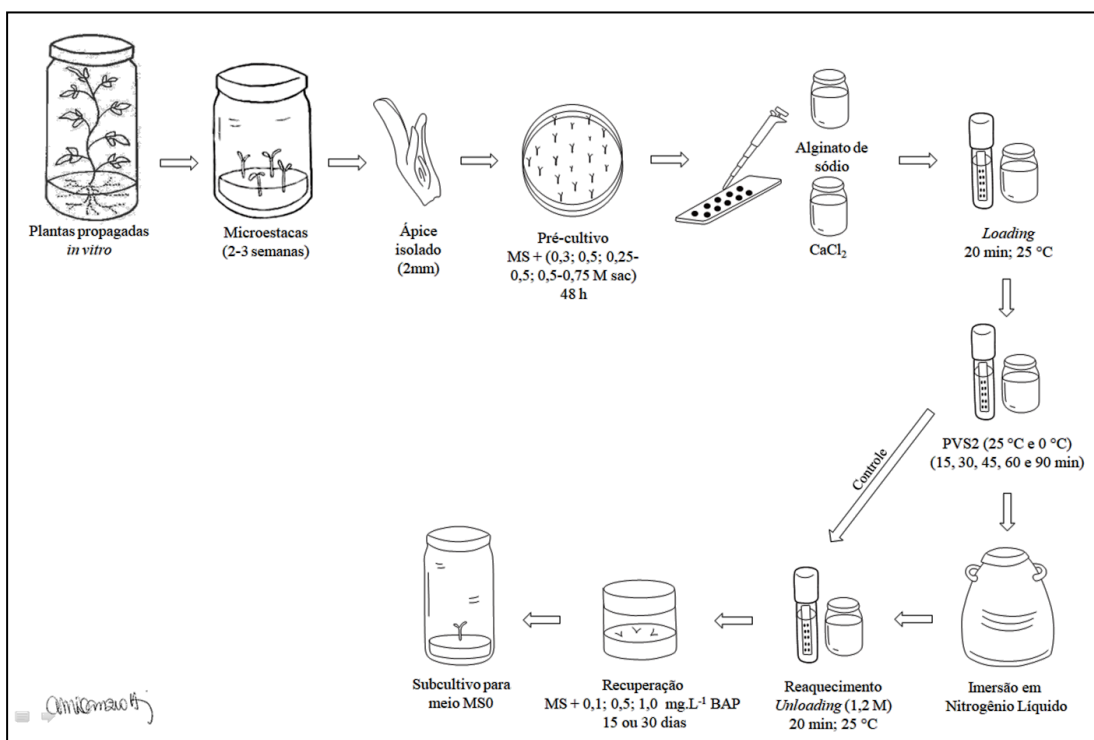
Para o reaquecimento do material, as Crioplacas foram removidas do NL e imersas diretamente em solução de alta osmolaridade, denominada solução *unloading* (meio MS acrescido de 1,2 M sacarose), onde permaneceram por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os ápices foram removidos das Crioplacas com auxílio de uma pinça, secos em papel de filtro (Whatman n°1) e transferidos para frascos de cultura (4,5 cm X 4,5 cm) contendo 15 mL de meio MS sólido acrescido de diferentes concentrações da citocinina BAP (0,1; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹). Foram inoculados três a quatro ápices por frasco, os quais permaneceram no escuro durante 24 h. Após este período, as culturas foram transferidas para luz difusa (20 μmol m⁻² s⁻¹) por sete dias e em seguida para condições de luminosidade padrão (45 μmol m⁻² s⁻¹). O tempo de exposição ao regulador de

crescimento também foi avaliado. Os ápices foram mantidos na presença de BAP por 15 ou 30 dias e a seguir, transferidos para meio MS0.

Para investigar o efeito dos tratamentos de criopreservação sem a etapa de resfriamento em NL, os ápices foram tratados como descrito anteriormente, porém foram lavados em solução de *unloading* por 20 minutos logo após a exposição ao PVS2 e inoculados em meio de recuperação.

O protocolo de V-Crioplaca está esquematizado na Figura 5.

Figura 5 – Etapas metodológicas estabelecidas para a técnica de V-Crioplaca.



Legenda: Ilustração por Adriana Lanziotti.

3.2.3 Técnica de D-Crioplaca

3.2.3.1 Etapa de pré-cultivo

Os ápices caulinares (1,5 mm) isolados das microestacas foram submetidos ao pré-cultivo em placas de Petri contendo 25 mL de meio MS sólido suplementado com altas concentrações de sacarose (0,3 ou 0,5 M) por 48 h ou em concentrações crescentes do açúcar (0,25 - 0,5; 0,5 - 0,75), permanecendo por 24 h em cada concentração. As placas foram mantidas em sala de cultura sob as condições padrão anteriormente descritas.

O teor hídrico residual após o pré-cultivo foi determinado com base nos pesos de matéria fresca e seca de 15 ápices submetidos a cada um dos tratamentos avaliados, obedecendo a seguinte fórmula:

$$\text{Teor hídrico} = \frac{(PF-PS)}{PF} \times 100$$

O peso de matéria seca foi determinado após 24 h em estufa a 60 °C.

A viabilidade dos ápices foi avaliada 30 dias após o pré-cultivo através da transferência do material para meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP.

3.2.3.2 Exposição ao *loading* e dessecação em sílica gel

Após o pré-tratamento, os ápices foram aderidos às Crioplacas, como descrito no item 3.2.1, utilizando as soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio a 0,09 M ou 0,6 M de sacarose. O efeito do tratamento com a solução de *loading* (2,0 M de glicerol e 0,4 M de sacarose) foi avaliado utilizando-se diferentes períodos de exposição (20 min e 40 min), além do aumento na concentração de sacarose (0,8 M) por exposição de 20 minutos. Após o tratamento com *loading*, o material foi dessecado na presença de sílica gel por diferentes períodos de tempo (30, 60, 90, 120, 150 e 180 min) a 25°C.

Para a realização da dessecação, foram preparados frascos de vidro (6,0 x 5,5 cm) contendo cerca de 50 g de sílica gel (1-4 mm; Sigma). Os frascos foram autoclavados e, em seguida, mantidos em estufa a 100 °C por cerca de 48 h para garantir a qualidade da sílica. A seguir, uma folha de papel de filtro, também estéril, foi disposta sobre a camada de sílica gel e as Crioplacas foram transferidas para os frascos (2 Crioplacas/frasco). O nível de dessecação do material foi aferido com base no teor hídrico residual, segundo a fórmula descrita acima. Para avaliar a viabilidade dos ápices sem a etapa de resfriamento em NL, o material foi transferido para meio MS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP após a exposição à sílica gel.

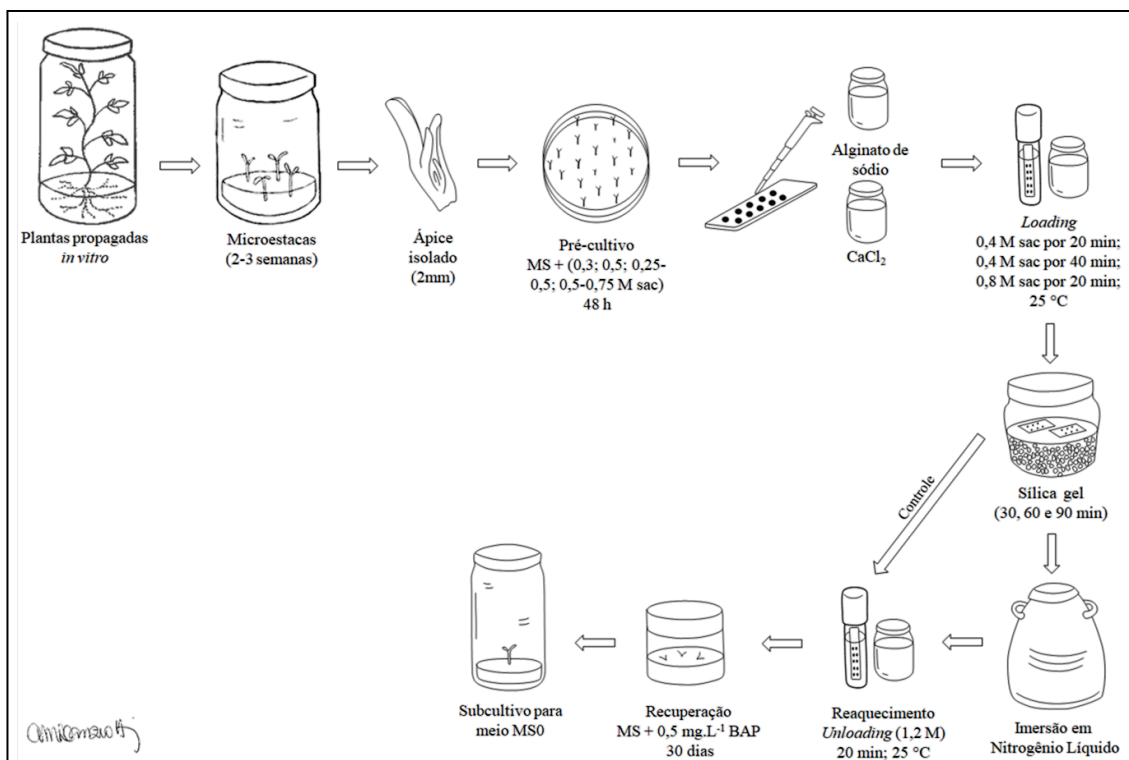
Após as etapas de desidratação, as Crioplacas foram transferidas para criotubos preenchidos com NL, onde permaneceram por cerca de 15 min.

3.2.3.3 Reaquecimento e recuperação

Essas etapas seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente no item 3.3.2.1. Porém, foi testada apenas uma concentração de BAP (0,5 mg.L⁻¹) por 15 ou 30 dias.

O protocolo padrão de D-Crioplaca está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 – Etapas metodológicas estabelecidas para a técnica de D-Crioplaca.



Legenda: Ilustração por Adriana Lanzotti.

3.2.4 Análise estatística

A eficiência do processo de criopreservação foi avaliada através da sobrevivência (percentual de ápices que apresentam coloração verde e início de crescimento), aferida quatro semanas após a criopreservação e pela recuperação (percentual de plantas completas regeneradas), oito semanas após a criopreservação.

Para cada tratamento foram utilizados 30 ápices, constituindo 3 (três) repetições com 10 ápices. Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Os dados foram apresentados nas tabelas como média \pm erro padrão.

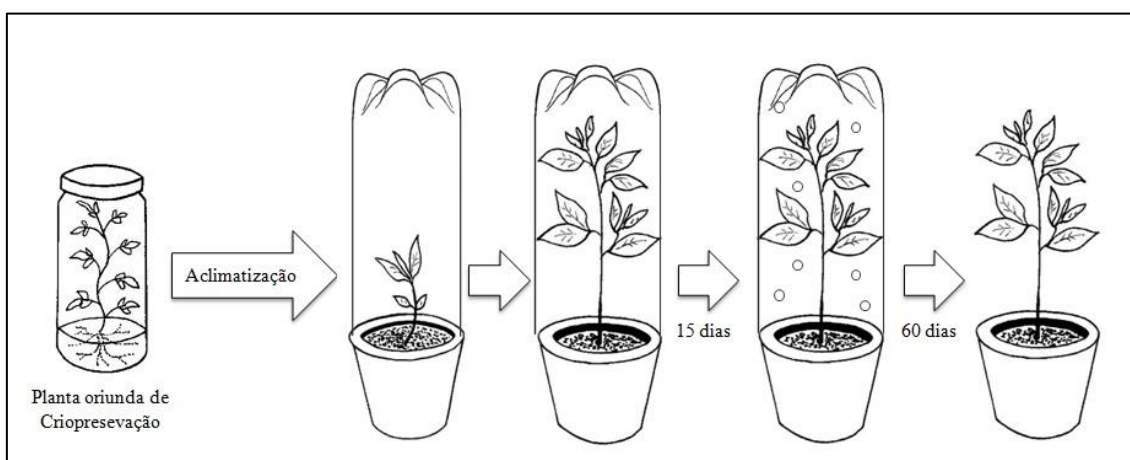
3.3 Aclimatização

Para a etapa de aclimatização, foram utilizadas plantas com 16 semanas de desenvolvimento, recuperadas após o processo de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca. O procedimento foi realizado conforme descrito por Albarello e colaboradores (2013).

Foram selecionadas nove plantas propagadas *in vitro* mantidas nas condições de cultivo padrão (item 3.1) por 16 semanas com, em média, 10 cm de altura. Com o auxílio de uma pinça, as plantas foram retiradas dos frascos e suas raízes foram lavadas em água corrente para a remoção do excesso dos resíduos de meio de cultura. Em seguida, foram transplantadas para vasos de jardinagem (7 x 10,5 cm) contendo terra preta adubada e cobertos com campânulas plásticas transparentes. Os vasos foram dispostos em bandejas plásticas com uma fina lâmina de água a qual foi trocada a cada dois dias e mantidos a 28 ± 3 °C sob fotoperíodo de 12 horas. Após 15 dias, as campânulas foram gradualmente perfuradas com um estilete e totalmente removidas ao final de 60 dias (Figura 7). Após a retirada das campânulas, foram acrescidos, semanalmente, 2 mL de solução de sais do meio MS por um período de 30 dias.

A altura das plantas, o número de folhas e a taxa de aclimatização foram aferidos após 30 e 60 dias, em condições *ex vitro*.

Figura 7 - Etapas metodológicas empregadas para a Aclimatização das plantas.



Legenda: Ilustração por Adriana Lanzotti

3.4 Análise da estabilidade genética

Os experimentos de estabilidade genética foram realizados no Laboratório de Marcadores Moleculares de Plantas (LMMP) pertencente ao NBV, sob supervisão da Bióloga Dra. Lívia da Silva Cordeiro, bolsista do programa Qualitec/UERJ.

3.4.1 Material vegetal

Para a avaliação da estabilidade genética, nove plantas propagadas *in vitro* foram selecionadas randomicamente e numeradas de 1 até 9. Ápices caulinares excisados dessas plantas foram criopreservados pela técnica de V-Crioplaca utilizando o seguinte protocolo: pré-cultivo em meio MS contendo concentrações crescentes de sacarose (0,25 M - 0,5 M), permanecendo 24h em cada concentração; exposição à solução de *loading* por 20 minutos e solução PVS2 (0 °C) por 90 minutos; seguido de imersão (+NL) ou não (-NL) em nitrogênio líquido; utilizando meio MS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP por 15 dias como condição de recuperação. As plantas regeneradas (+NL e -NL) a partir dos ápices caulinares criopreservados, com 12 semanas de cultivo *in vitro*, foram comparadas às suas respectivas plantas matrizes quanto aos seus padrões de amplificação obtidos por meio das técnicas de marcadores moleculares SCoT (*Start Codon Targeted Polymorphism*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Figura 8).

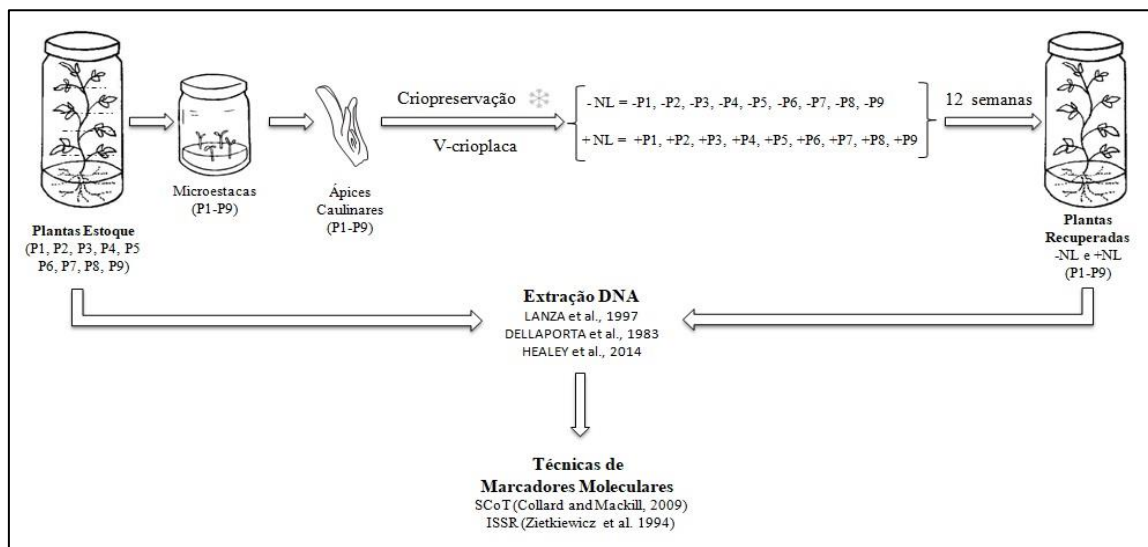
3.4.2 Extração e quantificação de DNA

Foram avaliados três protocolos distintos visando à extração do DNA genômico da espécie: CTAB (LANZA et al., 1997), SDS (DELLAPORTA et al., 1983) e CTAB modificado (HEALEY et al., 2014). Para a determinação do melhor rendimento, foram utilizadas diferentes quantidades de folhas (100, 150, 200 e 250 mg). As folhas excisadas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio devidamente identificados, mantidos em nitrogênio líquido até o momento da realização dos experimentos.

Para verificar a quantidade e qualidade do DNA extraído, alíquotas de DNA obtidas de cada amostra foram quantificadas em gel de agarose 0,8 % preparado com tampão TBE 1x. A eletroforese foi realizada a 150V por 60 minutos. O gel foi corado com $0,04\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ (v/v) de *Brilliant Green Plus DNA Stain* (Neotaq), visualizado sob luz ultravioleta e posteriormente fotografado pelo programa de captura de imagens L-Pix-ST Loccus Biotecnologia. A concentração da amostra após a extração de DNA foi determinada mediante a comparação visual da intensidade das bandas geradas com as do padrão λ (25, 50, 75 e $100\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$).

Uma vez determinado o protocolo mais adequado para a extração, as amostras de DNA obtidas foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para serem utilizadas nos ensaios de marcadores moleculares.

Figura 8 - Etapas metodológicas para a seleção do material botânico utilizado para as análises moleculares.



Legenda: Ilustração por Adriana Lanzotti.

3.4.3 Análise pela técnica SCoT (*Start Codon Targeted Polymorphism*)

Foram avaliados 15 oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) compostos por 18 bases, projetados por Collard e Mackil (2009) e utilizados por Rathore e colaboradores (2013) para outra espécie do gênero *Cleome* (Quadro 1).

Para as reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) da técnica SCoT foi testada a metodologia descrita por Collard e Mackil (2009). As reações de PCR continham 25 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,24 mM de dNTP e 0,8 μM de *primer* e água Milli-Q para completar o volume final de 10 μl. Foram avaliadas duas concentrações de Taq DNA polimerase (Sigma), 1,5 U e 2,5 U.

As reações foram realizadas em um termociclador PTC (Mastercycler, Eppendorf) e o programa de amplificação utilizado consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos constituídos de: desnaturação a 94 °C por 1 min, etapa de anelamento a 50 °C durante 1 min, extensão a 72 °C durante 2 min e finalização com 1 ciclo a 72 °C por 5 min (Collard; Mackill, 2009). Visando otimizar as condições de PCR, para obtenção de bandas nítidas e reprodutíveis, também foram avaliadas outras duas temperaturas de anelamento: 48 e 52 °C.

3.4.4 Análise pela técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Foram avaliados 17 *primers* (Quadro 1) utilizados em estudos com *C. spinosa* a fim de selecionar aqueles que resultassem em um maior número de bandas (DOMYATI et al., 2011). As reações de PCR continham 25 ng de DNA, tampão PCR 1x, 3,0 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 0,8 μM de *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sigma) e água Milli-Q para completar o volume final de 10 μl.

As reações foram realizadas em um termociclador PTC (Mastercycler, Eppendorf) e o programa de amplificação utilizado consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos constituídos de: desnaturação a 94°C por 1 min, etapa de anelamento a 40 °C durante 2 min, extensão a 72°C durante 2 min e finalização com 1 ciclo a 72 °C por 7 min. Também foram avaliadas outras temperaturas de anelamento, a saber: 42, 45 e 48 °C.

3.4.5 Análise dos produtos de amplificação gerados a partir das técnicas SCoT e ISSR

Para a visualização dos resultados obtidos com ambas as técnicas de marcadores moleculares, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose preparado com tampão TBE 1x, corados com $0,04\mu\text{L.mL}^{-1}$ (v/v) de *Brilliant Green Plus DNA Stain*. As eletroforeses foram realizadas a 150 v por 150 minutos em gel de agarose a 1,4% e a 80 v por 240 min em gel de agarose a 1,8%, para as técnicas SCoT e ISSR, respectivamente. O padrão de bandas formado no gel foi visualizado sob luz ultravioleta e posteriormente fotografado pelo programa de captura de imagens L-Pix-ST Loccus Biotecnologia. Todas as amplificações foram repetidas duas vezes e somente as bandas reprodutíveis foram consideradas para análise. O tamanho dos produtos de amplificação gerados foi inferido por meio de comparação com o marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (100-3000 bp)

Foi realizada avaliação quanto à presença ou ausência de bandas nas amostras de plantas obtidas a partir de ápices caulinares criopreservados (-NL e +NL), em comparação com suas respectivas plantas matrizes. O grau de similaridade das amostras foi calculado tomando como base o índice de Jaccard (JACCARD, 1908).

$$[SG (ij)] = \frac{a}{(a + b + c)}$$

Em que :

I = Planta Matriz (Px);

J = Amostras (Px- e Px+);

a = Número total de bandas comuns a todos os indivíduos;

b = Número total de bandas que aparecem em I, mas não aparecem em J;

c = Número total de bandas que aparecem em J, mas não aparecem em I.

Quadro 1 - *Primers* utilizados na triagem inicial para as técnicas de SCoT e ISSR.

SCoT		ISSR	
Código do <i>primer</i>	Sequência (5' → 3')	Código do <i>primer</i>	Sequência (5' → 3')
S1	CAACAATGGCTACCACCA	I1	CTCTCTCTCTCTCTTTG
S2	CAACAATGGCTACCACCC	I2	CTCTCTCTCTCTCTTAG
S3	CAACAATGGCTACCACCG	I3	CTCTCTCTCTCTCTTGC
S4	CAACAATGGCTACCACCT	I4	CACACACACACAAC
S5	CAACAATGGCTACCACGA	I5	CACACACACACAGT
S6	CAACAATGGCTACCACGC	I6	GAGAGAGAGAGAGG
S7	CAACAATGGCTACCACGG	I7	GTGTGTGTGTGTGG
S12	ACGACATGGCGACCAACG	I8	GAGAGAGAGAGACC
S13	ACGACATGGCGACCATCG	I9	GTGTGTGTGTGTCC
S16	ACCATGGCTACCACCGAC	I10	CACCACCACGC
S17	ACCATGGCTACCACCGAG	I11	GAGGAGGAGGC
S27	ACCATGGCTACCACCGTG	I12	CTCCTCCTCGC
S28	CCATGGCTACCACCGCCA	I13	GTGGTGGTGGC
S32	CCATGGCTACCACCGCAC	I14	GTGTGTGTGTGTGTGTC
S33	CCATGGCTACCACCGCAG	I15	ACACACACACACACAG
-	-	I16	CACACACACACAAG
-	-	I17	CACACACACACAGG

3.5 Determinação do perfil fitoquímico

Os experimentos fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) e no Laboratório de Cromatografia (Cromatolab), ambos pertencentes ao NBV, sob supervisão dos Farmacêuticos MSc. Iranilda Calado e MSc. Eduardo Nunes da Fonseca (IBRAG/UERJ). As análises por cromatografia líquida de alta acoplada a detector de UV, foram realizadas na Central Analítica Fernanda Coutinho – Instituto de Química (UERJ), sob supervisão do Farmacêutico MSc. Eduardo Nunes da Fonseca.

3.5.1 Material vegetal

Para a análise fitoquímica foram utilizados materiais coletados a campo e obtidos sob condições *in vitro*. O material *in vivo* (PV), constituído de parte aérea (folha e caule), foi coletado em fevereiro de 2019, quando as plantas estavam no período de floração. O material produzido sob condições *in vitro* apresentou duas origens: plantas propagadas *in vitro*, mantidas como estoque em meio MS0 (PE) e plantas regeneradas *in vitro* a partir do desenvolvimento de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca (PC).

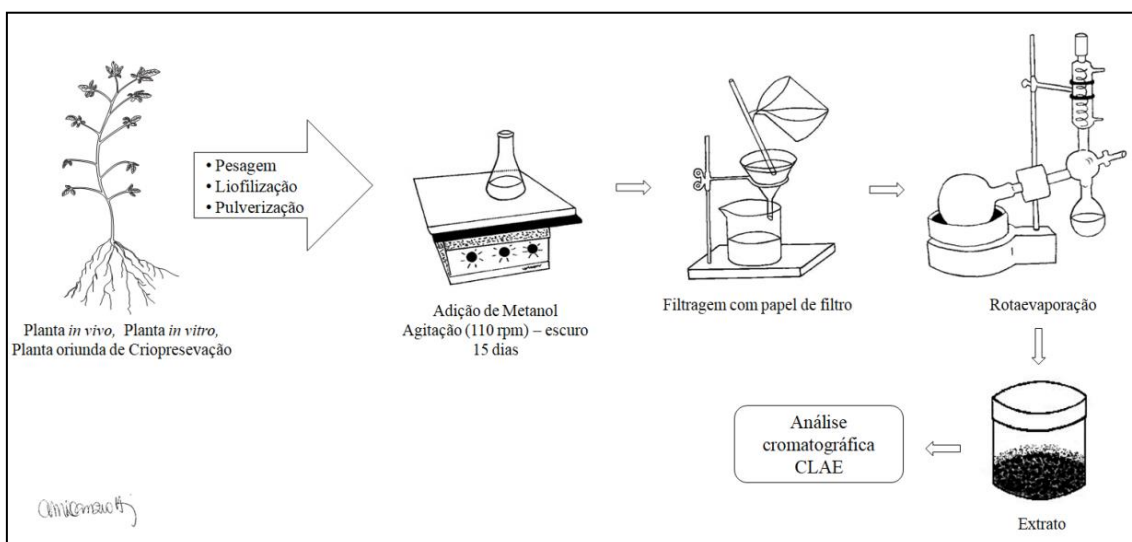
3.5.2 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos vegetais (Figura 9), o material obtido a partir de diferentes origens foi pesado, identificado e armazenado em frascos transparentes (13 cm x 6,5 cm) à temperatura de -20 °C por dois dias. Após o congelamento, foram liofilizados por cinco dias e, em seguida, pulverizados com o auxílio de moinho IKA® WERKE (MF10 *basic*).

O material vegetal seco (10g) foi submetido à extração por maceração em metanol P.A (VETEC; 125 mL). Os frascos foram mantidos no escuro, sob agitação constante

(110 rpm) e à temperatura de 26 ± 2 °C por 14 dias. Após esse período, as amostras foram filtradas em papel Whatman (n° 1) e concentradas sob vácuo em evaporador rotatório (Marconi®) a 35 °C.

Figura 9 - Etapas metodológicas empregadas para a preparação e extratos metanólicos por maceração.



Legenda: Ilustração por Adriana Lanzioti

3.5.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV)

Os extratos foram diluídos em metanol grau espectroscópico (Tedia, Brasil) na concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Em seguida, foram solubilizados em ultrassom por 15 minutos e filtrados em filtros Millipore de $0,45 \mu\text{m}$. (Merck Alemanha).

As amostras foram submetidas à análise por cromatografia com fase líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido (ultra) Agilent® 1260 Infinity, equipado com bomba LC-10AD, misturador FCV 10AL, desgaseificador DGU-14A, forno CTO-10AS, controlador SCL-10A e detector de UV com arranjo de diodos (DAD-UV) SPD-M10A. As amostras foram separadas em coluna Thermo Scientific® Hypersil Gold RP18 (250 mm x 4,6 mm com partícula de 5 \AA). A eluição da fase móvel ocorreu por gradiente do tipo rampa, com início em 95 % de água ultrapura (MilliQ®) acidificada com ácido acético glacial (Sigma-Aldrich®) a pH 3,5, denominado solvente A, e 5 % de acetonitrila (Tedia®), denominado solvente B, (0 - 2 min), decaimento de 95 % de A e 5 % de B, para

0 % de A e 100 % de B (2 - 45 min), 100 % de B (45 – 55 min) e, retorno para condição inicial nos cinco minutos finais (55 - 60 min). A obtenção dos espectros UV ocorreu no intervalo de 210 e 600 nm. O fluxo foi de 1 mL/min e um volume de injeção de 10 μ L.

Os resultados foram submetidas à análise de Cluster usando como base o coeficiente de similaridade segundo Jaccard (JACCARD, 1908) e um dendrograma foi construído com o programa PAST a partir dos resultados de agrupamento.

4 RESULTADOS

4.1. Criopreservação por V-Crioplaca

Os primeiros experimentos com a técnica de V-Crioplaca, basearam-se no cultivo dos ápices em meio de recuperação suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP (0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) por um período de 30 dias.

Ápices não resfriados expostos à PVS2 a 25°C por 15 a 60 minutos (Tabela 1) não apresentaram diferenças significativas nas porcentagens de sobrevivência quando inoculados em meio acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP por 30 dias. Porém, quando o tempo de exposição à solução crioprotetora foi ampliado para 90 min, ocorreu redução significativa dos valores de sobrevivência. Com relação à recuperação desses materiais, os valores alcançados apresentaram redução estatisticamente significativa após a exposição a 60 e a 90 min. Por outro lado, a exposição dos ápices não resfriados à PVS2 na temperatura de 0°C resultou em valores de sobrevivência de 86 a 100% e de recuperação de 76 a 100%, sem apresentar diferenças estatísticas, independentemente do tempo de exposição à solução crioprotetora.

Para os ápices resfriados em NL e tratados com PVS2 a 25°C, não foram observadas taxas de sobrevivência e, conseqüentemente, de recuperação para os tratamentos com menores tempos (15 e 30 min) e nem pelo período mais longo de exposição (90 min). Os maiores valores médios de sobrevivência (13%) e recuperação (10%) foram observados após exposição por 45 minutos à solução de vitrificação. Entretanto, quando a temperatura de exposição à PVS2 foi reduzida (0°C), observou-se um aumento das taxas de sobrevivência (43%) e recuperação (23%) no tratamento por 60 min (Tabela 1).

Os brotos regenerados a partir de ápices não resfriados em NL (Figura 10a), apresentaram um desenvolvimento mais rápido quando comparados àqueles oriundos de ápices criopreservados (Figura 10b). Após a primeira semana em meio de recuperação, esses brotos já apresentavam o primeiro par de folhas, enquanto esta resposta só foi observada no material resultante de imersão em NL com 15 dias em cultura. Observou-se que os brotos provenientes do tratamento controle eram mais alongados do que aqueles

desenvolvidos a partir de ápices imersos em NL. Porém, a transferência para meio MS0 possibilitou o alongamento dos brotos criopreservados (Figura 10c).

Apesar das baixas porcentagens de sobrevivência e recuperação, o cultivo dos ápices por 30 dias em presença de BAP em concentração reduzida ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) não afetou o processo de enraizamento, principalmente para os ápices não imersos em NL. Ápices cultivados em meio acrescido de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP já apresentavam o desenvolvimento de raízes após 15 dias em meio de recuperação (Figura 10a). Quando transferidas para MS0, tanto as partes aéreas como as raízes se alongaram, possibilitando sua manutenção *in vitro* por longos períodos.

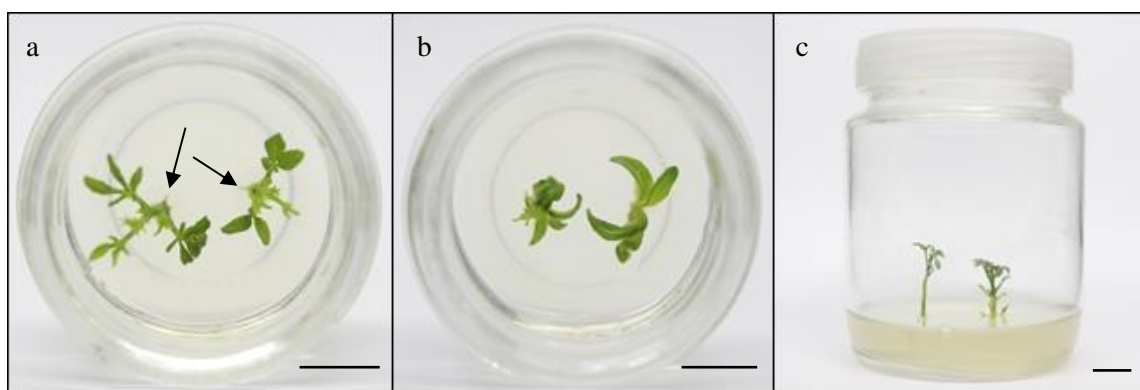
Tabela 1 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* pela técnica de V-Crioplaca utilizando a suplementação do meio de recuperação com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, por 30 dias.

Temperatura de exposição à PVS2	Tempo de exposição à PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
		- NL	+ NL	- NL	+ NL
25°C	0	100±0,0 ^a	0 ^b	100±0,0 ^a	0 ^b
	15	100±0,0 ^a	0 ^b	73,3±8,8 ^a	0 ^b
	30	100±0,0 ^a	0 ^b	63,3±3,3 ^{ab}	0 ^b
	45	100±0,0 ^a	13,3±13,3 ^{ab}	53,3±3,3 ^{ab}	10±10 ^{ab}
	60	76,7±14,5 ^{ab}	6,6±6,6 ^{ab}	43,3±3,3 ^b	3,3±3,3 ^{ab}
	90	60,0±5,7 ^b	0 ^b	43,3±3,3 ^b	0 ^a
0°C	0	100±0,0 ^a	0 ^b	100±0,0 ^a	0 ^b
	15	100±0,0 ^a	0 ^b	96,7±3,3 ^a	0 ^b
	30	100±0,0 ^a	0 ^b	86,7±6,6 ^a	0 ^b
	45	86,7±13,3 ^{ab}	3,3±3,3 ^{ab}	83,3±12 ^a	3,3±3,3 ^{ab}
	60	100±0,0 ^a	43,3±3,3 ^a	90,0±5,7 ^a	26,6±3,3 ^a
	90	96,7±3,3 ^a	3,3±3,3 ^{ab}	76,7±6,6 ^a	3,3±3,3 ^{ab}

Os dados representam média ± erro padrão.

Letra iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 10 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à PVS2 a 0°C por 60 min e posterior recuperação em meio MS com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.



Legenda: Sobrevivência sem imersão em NL (a); Sobrevivência após imersão em NL (b); Recuperação após imersão em NL (c). As setas indicam rizogênese. Barras = 1 cm.

A suplementação do meio de recuperação com uma maior concentração (1,0 mg.L⁻¹) de BAP por 30 dias, resultou em um aumento nos valores percentuais de sobrevivência e recuperação para os ápices não imersos em NL, principalmente com relação ao uso da PVS2 na temperatura ambiente (Tabela 2). Estes materiais apresentaram taxas de sobrevivência que variaram de 96 a 100%, e taxas de recuperação de 80 a 100%, independentemente da temperatura ou tempo de exposição utilizados no tratamento com a solução de vitrificação.

O efeito positivo do aumento da concentração de BAP no meio de recuperação foi visivelmente perceptível quando a resposta de recuperação dos ápices resfriados em NL foi avaliada. De um modo geral, houve aumento das taxas de sobrevivência e recuperação em todas as condições avaliadas. Além disso, independentemente da temperatura de exposição à PVS2, foi observado um aumento gradativo da eficiência do processo de criopreservação com o aumento do tempo de exposição à solução.

Ápices resfriados submetidos à PVS2 a 25°C atingiram uma taxa de sobrevivência de até 30% quando expostos à solução por 90 minutos e 23% de recuperação para o mesmo tratamento (Tabela 2).

A diminuição da temperatura de exposição à solução PVS2 (0°C) associada ao aumento da concentração do regulador de crescimento, promoveu um aumento significativo dos parâmetros avaliados. Quando os ápices criopreservados foram expostos à solução de vitrificação por 90 minutos, foi alcançada uma taxa de sobrevivência de 73% (Tabela 2). Para o mesmo tratamento, obteve-se 66% de recuperação, um percentual vinte

vezes maior em relação à resposta obtida quando o meio de recuperação foi suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP.

Como já observado anteriormente, a temperatura de exposição à solução crioprotetora não só influenciou a quantidade, mas também a qualidade das plantas obtidas. O tratamento com a solução crioprotetora realizado à temperatura ambiente, com exposição à PVS2 por 15 e 30 min, possibilitou o desenvolvimento de plantas de aspecto fenotípico normal, tanto a partir de ápices não resfriados (Figura 11a-e), quanto para aqueles imersos em NL (Figura 11f e 11g). Contudo, para o material tratado por maiores períodos de tempo, a exposição à solução promoveu hiperhidricidade nos ápices, que apresentaram apenas o desenvolvimento de primórdios foliares verde-escuros, principalmente nos tratamentos por 45 e 60 min (Figura 11h e 11i). Esses ápices apresentaram apenas o desenvolvimento de primórdios foliares verde-escuros e com aspecto hiperhídrico. Embora em menor grau, a hiperhidricidade também foi observada em ápices tratados por 90 min (Figura 11j). Já quando a PVS2 foi utilizada a 0°C , foi evidenciada uma diminuição da ocorrência de hiperhidricidade para todos os tempos avaliados, independentemente da imersão em NL, conforme pode ser observado na figura 12.

O aumento da concentração de BAP influenciou o processo rizogênico. As raízes formadas em meio suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP apresentavam um tamanho menor quando comparadas àquelas desenvolvidas em meio contendo $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Esses resultados foram observados em todos os tratamentos avaliados, independentemente do tempo ou temperatura de exposição à solução de vitrificação.

Após a transferência para meio MS0, tanto os brotos oriundos de ápices não resfriados (Figura 13a), como aqueles obtidos após a criopreservação apresentaram desenvolvimento normal. Neste caso, destaca-se o tratamento utilizando PVS2 a 0°C por 90 minutos (Figura 13b), no qual foram alcançadas as maiores porcentagens de recuperação. Essas plantas mantiveram a capacidade de multiplicação *in vitro* após 90 dias da criopreservação, originando plantas de aspecto fenotípico normal (Figura 13c) e raízes vigorosas (Figura 13d).

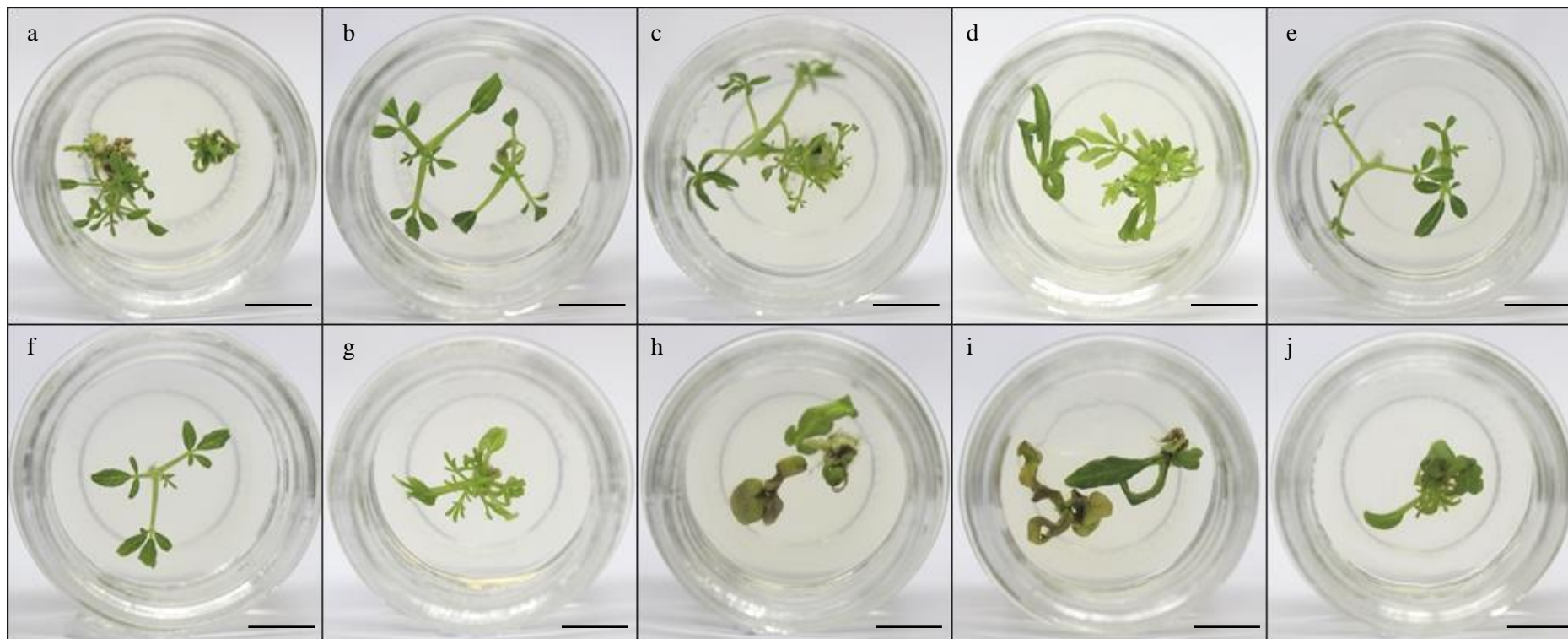
Tabela 2 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* pela técnica de V-Crioplaca utilizando a suplementação do meio de recuperação com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.

Temperatura de exposição à PVS2	Tempo de exposição à PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
		- NL	+ NL	- NL	+ NL
25°C	0	100±0,0 ^a	0 ^c	100±0,0 ^a	0 ^c
	15	100±0,0 ^a	3,3±3,3 ^c	83,3±3,3 ^{ab}	3,3±3,3 ^c
	30	100±0,0 ^a	3,3±3,3 ^c	86,7±6,7 ^{ab}	3,3±3,3 ^c
	45	96,7±3,3 ^a	13,3±6,6 ^{bc}	76,7±3,3 ^b	10,0±0,0 ^c
	60	100±0,0 ^a	16,6±3,3 ^{bc}	86,7±3,3 ^{ab}	13,3±3,3 ^{bc}
	90	96,7±3,3 ^a	30,0±5,7 ^b	80,0±0,0 ^b	23,3±3,3 ^b
0°C	0	100±0,0 ^a	0 ^c	100±0,0 ^a	0 ^c
	15	100±0,0 ^a	0 ^c	100±0,0 ^a	0 ^c
	30	100±0,0 ^a	6,6±3,3 ^{bc}	100±0,0 ^a	3,3±3,3 ^c
	45	96,7±3,3 ^a	20,0±5,7 ^{bc}	93,3±3,3 ^{ab}	3,3±3,3 ^c
	60	96,7±3,3 ^a	40,0±0,0 ^b	96,7±3,3 ^a	23,3±3,3 ^b
	90	100±0,0 ^a	73,3±3,3 ^a	96,7±3,3 ^a	66,6±3,3 ^a

Os dados representam média ± erro padrão.

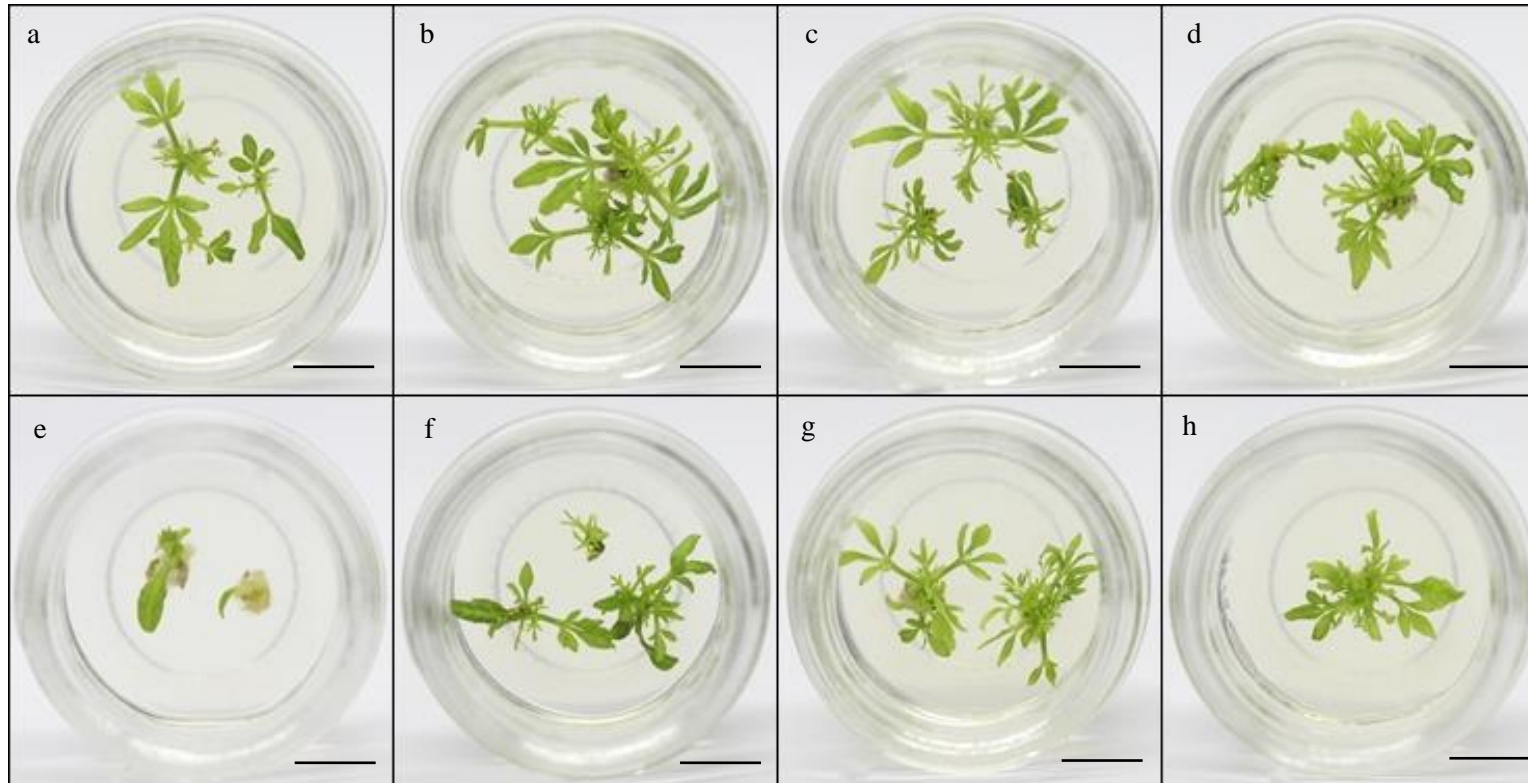
Letra iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 11 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 25°C e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.



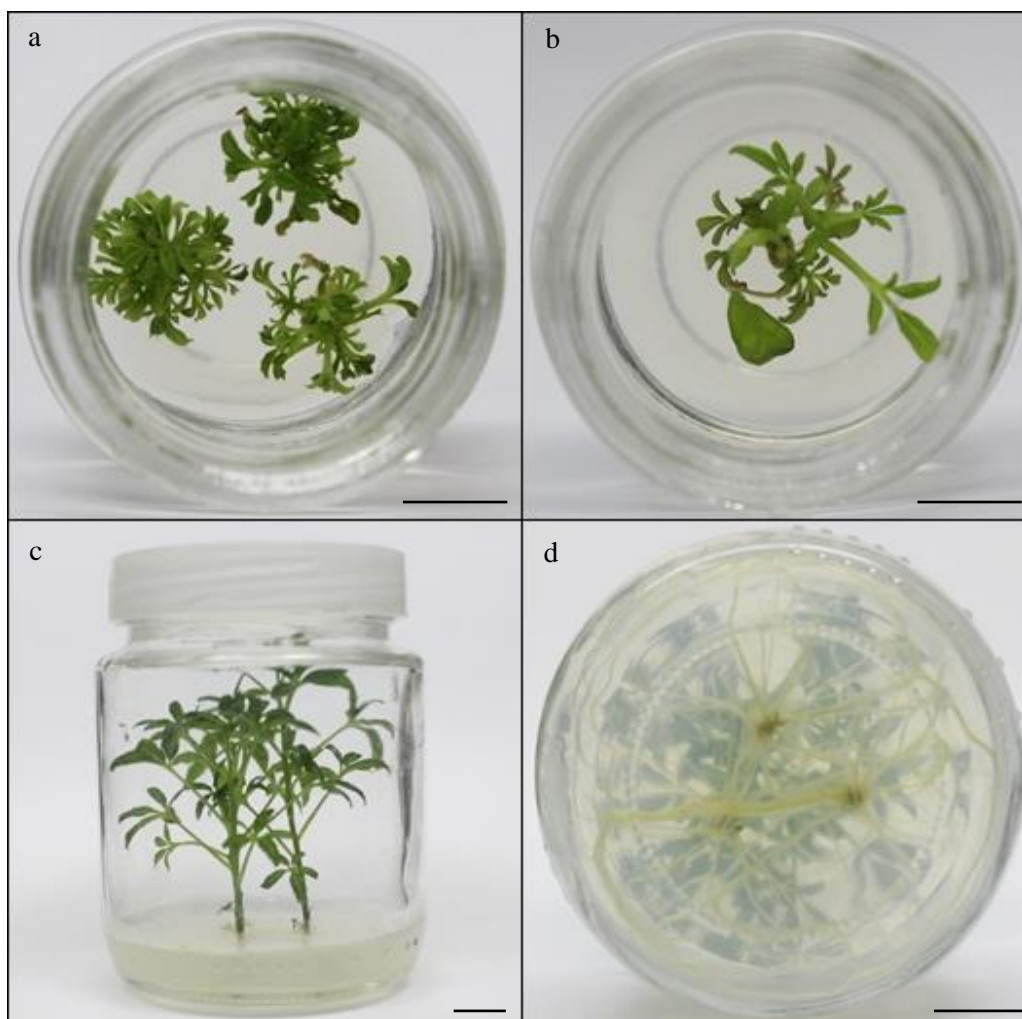
Legenda: Exposição por 15 (a, f); 30 (b, g); 45 (c, h); 60 (d, i); 90 minutos (e, j). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os ápices imersos em NL. Barras = 1 cm.

Figura 12 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 0°C e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.



Legenda: Exposição por 30 (a, e); 45 (b, f); 60 (c, g); 90 minutos (d, h). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e que a inferior representa os imersos em NL. Barras = 1 cm.

Figura 13 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 (0°C) por 90 min e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP por 30 dias.



Legenda: Recuperação sem imersão em NL após 60 dias (a); Recuperação com imersão em NL após 60 dias (b); Plantas após 90 dias da criopreservação (c); Detalhe do desenvolvimento de raízes após 90 dias da criopreservação (d). Barras = 1 cm.

Tendo em vista os resultados obtidos com a manutenção do material criopreservado por 30 dias em meio de recuperação, foram realizados novos experimentos utilizando o BAP por 15 dias por diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹).

Quando o meio de recuperação foi suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP, a redução do tempo de exposição ao regulador de crescimento resultou em diminuição nas taxas de sobrevivência para ápices não resfriados em NL (Tabela 3), quando comparado à manutenção em presença da mesma concentração de BAP por 30 dias (Tabela 1). Os maiores percentuais de sobrevivência foram obtidos após a tratamento com PVS2 nos

menores tempos de exposição (15 e 30 min), independentemente da temperatura empregada durante a exposição à solução crioprotetora. A recuperação de ápices não imersos em NL também foi reduzida nesta nova condição (Tabela 3). Assim como observado para a sobrevivência, os maiores valores foram alcançados nos menores tempos de exposição a PVS2 (25°C e 0°C), com redução progressiva à medida que o tempo de exposição à solução foi elevado.

Da mesma forma, o uso de BAP no meio de recuperação na menor concentração e por um menor período de tempo, também afetou negativamente a sobrevivência e recuperação dos ápices criopreservados (Tabela 3). Para os materiais submetidos a estas condições, valores máximos de sobrevivência e recuperação não ultrapassaram 6%, sendo restritos aos tratamentos por tempos iguais ou superiores a 45 min de exposição ao PVS2.

Tabela 3 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* pela técnica de V-Crioplaca utilizando a suplementação do meio de recuperação com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.

Temperatura de exposição à PVS2	Tempo de exposição à PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
		- NL	+ NL	- NL	+ NL
25°C	0	100±0,0 ^a	0 ^a	100±0,0 ^a	0 ^a
	15	90±0,0 ^a	0 ^a	73,3±3,3 ^b	0 ^a
	30	76,7±3,3 ^b	0 ^a	70,0±0,0 ^b	0 ^a
	45	70,0±5,7 ^b	6,6±3,3 ^a	56,7±3,3 ^b	6,6±3,3 ^a
	60	66,7±3,3 ^b	3,3±3,3 ^a	50,0±5,7 ^b	3,3±3,3 ^a
	90	53,3±3,3 ^c	0 ^a	46,7±3,3 ^b	0 ^a
0°C	0	100±0,0 ^a	0 ^a	100±0,0 ^a	0 ^a
	15	96,7±3,3 ^a	0 ^a	93,3±3,3 ^a	0 ^a
	30	83,3±3,3 ^a	0 ^a	80,0±0,0 ^{ab}	0 ^a
	45	66,7±3,3 ^b	0 ^a	63,3±3,3 ^b	0 ^a
	60	63,3±3,3 ^b	6,6±3,3 ^a	60,0±5,7 ^b	3,3±3,3 ^a
	90	60,0±0,0 ^b	6,6±3,3 ^a	56,7±3,3 ^b	3,3±3,3 ^a

Os dados representam média ± erro padrão.

Letra iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A suplementação do meio de recuperação com uma concentração intermediária (0,5 mg.L⁻¹) de BAP por 15 dias, resultou em um aumento nos valores percentuais de

sobrevivência e recuperação para os ápices não imersos em NL (Tabela 4), quando comparados ao experimento anterior (Tabela 3). Para esses materiais, conforme houve o aumento do tempo de exposição à PVS2 a 25°C, houve uma diminuição do percentual de sobrevivência. Ápices não resfriados expostos à PVS2 a 25°C por 15 e 30 minutos (Tabela 1) não apresentaram diferenças significativas nas porcentagens de sobrevivência, apresentando de 96 a 100%. Já aqueles expostos à mesma temperatura, porém por períodos mais longos (45, 60 e 90 min), apresentaram de 80 a 66% de sobrevivência. Esses materiais mantiveram taxas de recuperação proporcionais às de sobrevivência, as quais variaram de 100 a 60% para o menor (15 min) e o maior (90 min) tempo de exposição, respectivamente. Quando a solução crioprotetora foi utilizada a 0°C, houve um aumento das taxas de sobrevivência e recuperação para todos os tempos avaliados. Essas taxas não diferiram estatisticamente entre si e variaram de 100 a 93% (Tabela 4).

O uso de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP no meio de recuperação por 15 dias também favoreceu a sobrevivência e recuperação dos ápices criopreservados (Tabela 4). Ápices tratados com PVS2 a 25°C e imersos em NL obtiveram taxas de sobrevivência e recuperação de até 46% e 40%, respectivamente, quando expostos à solução crioprotetora por 45 min. A redução da temperatura de exposição à PVS2 (0°C) possibilitou que essas taxas alcançassem valores ainda maiores, principalmente quando a solução foi empregada por longos períodos. Ápices expostos à PVS2 (0°C) por 90 min alcançaram 83% de sobrevivência. Este tratamento também resultou no maior percentual de recuperação encontrado, 76%.

Conforme já evidenciado anteriormente, a temperatura de exposição à solução crioprotetora influenciou também a qualidade das plantas obtidas. Para ápices não imersos em NL, a exposição a PVS2 a 25°C resultou em brotos com aspecto normal (Figura 14a- 14e). Alguns desses, apresentaram o desenvolvimento de uma folha maior com aspecto hiperhídrico, próxima à base (Figura 14c e 14e). Ápices criopreservados utilizando PVS2 a 25°C pelos períodos de exposição extremos (15 e 90 min) resultaram em brotos de tamanho diminuto, com coloração escura e aspecto hiperhídrico (Figura 14f e 14j). Para a maioria desses brotos observou-se fragmentação das folhas no momento da transferência do meio suplementado com BAP para MS0 após 15 dias da imersão em nitrogênio líquido. Os tratamentos de 30 e 45 min resultaram em brotos um pouco maiores, porém ainda com algumas características de hiperhidricidade, como por exemplo folhas bem pequenas e claras (Figura 14g e 14h). Quando foram tratados por 60

min, os brotos originados apresentaram aspecto normal e eram mais desenvolvidos (Figura 14i).

O uso de uma concentração intermediária e a diminuição do tempo de exposição ao BAP quando associados aos tratamentos com PVS2 a 0°C, reduziu o teor de hiperhidricidade dos materiais. Em relação aos ápices que não foram imersos em NL, as plantas geradas apresentaram desenvolvimento, coloração e aspecto fenotípico normal (Figura 15a-15e). Já para os ápices criopreservados, observou-se uma correlação direta entre o aumento do tempo de exposição à solução crioprotetora e a diminuição do teor de hiperhidricidade. Quando tratados por 15 e 30 min, algumas plantas geradas apresentaram aspecto hiperhídrico (Figura 15f e 15g). Porém, quando tratadas por 45, 60 e 90 min, foi possível observar o desenvolvimento de plantas normais (Figura 15h, 15i e 15j). Além disso, essas plantas eram mais desenvolvidas quando comparadas àquelas obtidas após os tratamentos com o mesmo tempo de exposição à PVS2 na temperatura de 25°C (Figura 14h, 14i e 14j).

A temperatura de exposição à solução PVS2 também influenciou na resposta rizogênica quando foi utilizada a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP no meio de recuperação por 15 dias. Ápices, imersos ou não em NL, quando tratados com PVS2 a 0°C originaram brotos que já apresentavam início de formação de raízes ainda com 15 dias após o tratamento com a solução crioprotetora. Ao passo que quando tratados com PVS2 a 25°C, essa resposta só era observada após 30 dias.

Quando transferidos para meio MS0, tanto os brotos oriundos de ápices não resfriados (Figura 16a), como aqueles obtidos após a criopreservação, apresentaram desenvolvimento normal com alongamento do eixo caulinar e radicular. Destaca-se o tratamento utilizando PVS2 a 0°C por 90 minutos em que foram observadas as maiores porcentagens de recuperação (Figura 16b). Após 90 dias da criopreservação, essas plantas mantiveram a capacidade de multiplicação *in vitro*, originando plantas de aspecto fenotípico normal (Figura 16c) e raízes vigorosas (Figura 16d). Para os tratamentos em que foi evidenciada a hiperhidricidade, as plantas também se desenvolveram adequadamente, sobretudo aquelas oriundas de ápices expostos à PVS2 (25°C) por 45 e 60 min.

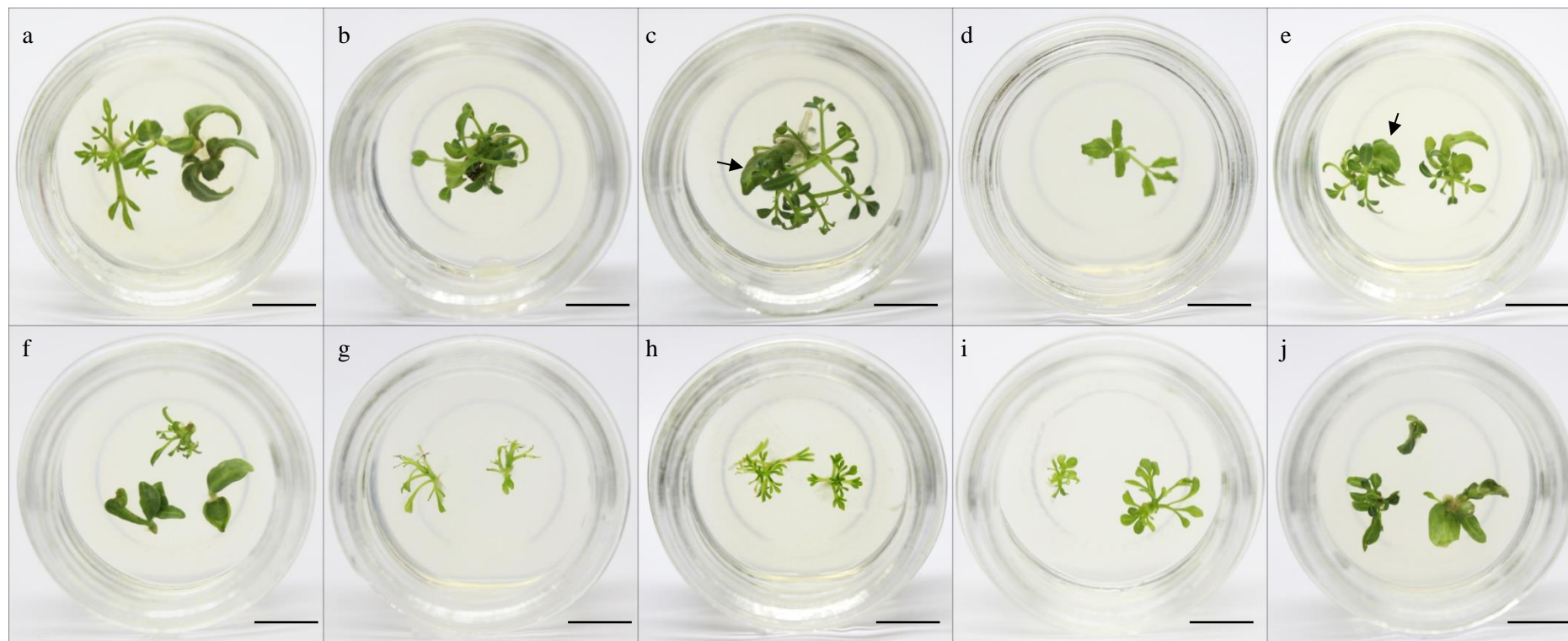
Tabela 4 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* pela técnica de V-Crioplaca utilizando a suplementação do meio de recuperação com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, por 15 dias.

Temperatura de exposição à PVS2	Tempo de exposição à PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
		- NL	+ NL	- NL	+ NL
25°C	0	100±0,0 ^a	0 ^e	100±0,0 ^a	0 ^d
	15	100±0,0 ^a	10,0±0,0 ^{de}	100±0,0 ^a	3,3±3,3 ^{cd}
	30	96,7±3,3 ^a	13,3±3,3 ^{de}	96,7±3,3 ^a	13,3±3,3 ^c
	45	80,0±5,7 ^b	30,0±5,7 ^c	80,0±5,7 ^b	23,3±3,3 ^{bc}
	60	76,7±3,3 ^{bc}	46,6±3,3 ^{bc}	73,7±3,3 ^c	40,0±0,0 ^b
	90	66,7±3,3 ^c	26,6±3,3 ^d	60,0±0,0 ^c	13,3±3,3 ^c
0°C	0	100±0,0 ^a	0 ^e	100±0,0 ^a	0 ^d
	15	100±0,0 ^a	3,3±3,3 ^e	100±0,0 ^a	3,3±3,3 ^{cd}
	30	100±0,0 ^a	23,3±3,3 ^d	100±0,0 ^a	23,3±0,0 ^{bc}
	45	96,7±3,3 ^a	50,0±0,0 ^b	96,3±3,3 ^a	40,0±5,7 ^b
	60	96,7±3,3 ^a	63,3,6±3,3 ^b	93,3±3,3 ^{ab}	56,6±3,3 ^b
	90	93,3±3,3 ^a	83,3±6,6 ^a	93,3±3,3 ^{ab}	76,6±3,3 ^a

Os dados representam média ± erro padrão.

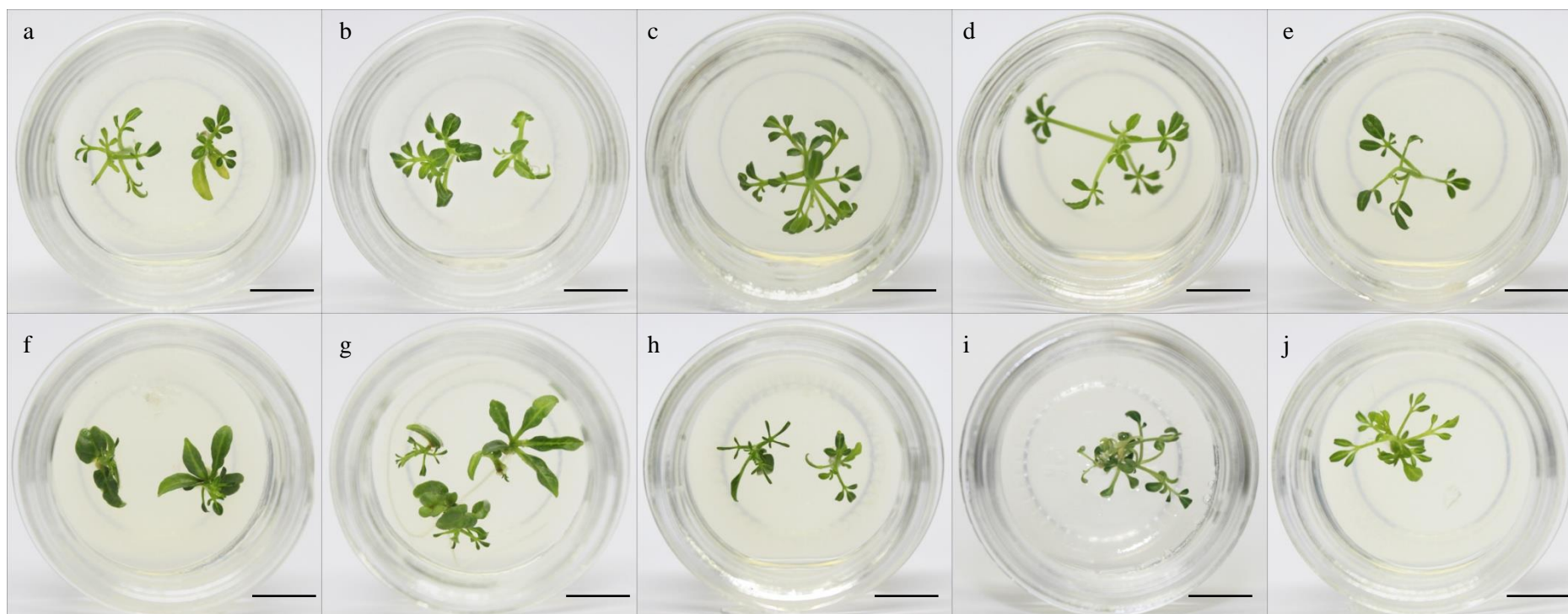
Letra iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 14 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 25°C e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.



Legenda: Exposição por 15 (a ,f); 30 (b, g); 45 (c, h); 60 (d, i); 90 minutos (e, j). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os ápices imersos em NL. As setas indicam a presença de folhas grandes com aspecto hiperhídrico próximas à base. Barras = 1 cm.

Figura 15 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 0°C e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.



Legenda: Exposição por 15 (a, f); 30 (b, g); 45 (c, h); 60 (d, i); 90 minutos (e, j). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os ápices imersos em NL. Barras = 1 cm.

Figura 16 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 (0°C) por 90 min e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.



Legenda: Recuperação sem imersão em NL após 60 dias (a); Recuperação com imersão em NL após 60 dias (b); Plantas após 90 dias da criopreservação (c); Detalhe do desenvolvimento de raízes após 90 dias da criopreservação (d). Barras = 1 cm.

A suplementação do meio de recuperação com uma maior concentração de BAP ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) por 15 dias também foi avaliada. Para os ápices não imersos em NL, a utilização de maior concentração do fitorregulador manteve as taxas de sobrevivência e recuperação elevadas, independentemente da temperatura e tempo de exposição à solução PVS2 (Tabela 5). Para esses materiais, as taxas de sobrevivência e recuperação variaram de 100 a 93%. Apenas foi possível observar uma redução estatisticamente significativa quando a PVS2 foi utilizada a 25°C por 90 min, em que foi obtido 83% e 80% de sobrevivência e recuperação, respectivamente.

Para ápices criopreservados, o cultivo em meio com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP por 15 dias resultou no aumento das taxas de sobrevivência e recuperação (Tabela 5), quando comparado ao uso da mesma concentração por 30 dias (Tabela 2). Quando a PVS2 foi utilizada a 25°C , os valores mais elevados de sobrevivência (40%) e recuperação (36%) foram obtidos após a exposição por 60 min. A diminuição da temperatura de exposição associada com o aumento do tempo de exposição a PVS2, influenciou positivamente a regeneração após a criopreservação (Tabela 5). Ápices imersos em NL e tratados com PVS2 a 0°C por 90 min, alcançaram as maiores taxas de sobrevivência (76%) e recuperação (66%). Entretanto, apesar dos valores obtidos, essas taxas não foram superiores às observadas quando o meio de recuperação foi suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP por 15 dias (Tabela 4).

De forma similar ao verificado nos experimentos anteriores, a temperatura de exposição à solução crioprotetora influenciou a qualidade das plantas obtidas. Para ápices não imersos em NL, a exposição à PVS2 na temperatura de 25°C pelos tempos de 15, 30, 45 min resultou em brotos com aspecto fenotípico normal (Figura 17a-17c). Entretanto, quando a exposição foi realizada à temperatura ambiente por períodos mais extensos, ocorreu a formação de brotos de coloração mais escura e com aspecto levemente hiperhídrico (Figura 17d e 17e). Já ápices criopreservados utilizando PVS2 a 25°C por 15, 30 e 90 min originaram brotos malformados de tamanho diminuto em que, muitas vezes, só era possível observar a presença de alguns primórdios foliares com aspecto hiperhídrico (Figura 17f, 16g e 17j). Por outro lado, nos tratamentos de 45 e 60 min os brotos eram um pouco maiores e com aspecto normal (Figura 17h e 17i).

De modo geral, quando a solução PVS2 foi empregada a 0°C , ocorreu a redução no nível de hiperhidricidade dos materiais, independentemente de terem sido submetidos ou não ao resfriamento em NL. Em relação aos ápices que não foram imersos em NL, as plantas geradas apresentaram desenvolvimento, coloração e aspecto fenotípico normais

(Figura 18a-18e). Já para os ápices criopreservados, quando tratados por 15 e 30 min, os brotos gerados apresentaram aspecto hiperhídrico (Figura 18f e 18g). Porém, quando tratados por 45, 60 e 90 min, foi possível observar o desenvolvimento de plantas normais (Figura 18h, 18i e 18j). Além disso, essas plantas eram mais desenvolvidas quando comparadas àquelas obtidas após os tratamentos com o mesmo tempo de exposição à PVS2 em 25°C (Figura 17h, 17i e 17j).

Assim como observado anteriormente, a temperatura de exposição à solução PVS2 também influenciou a resposta rizogênica. Quando tratados com PVS2 a 0°C, os ápices originaram brotos que já apresentavam início de formação de raízes ainda com 15 (-NL) e 30 (+NL) dias após o tratamento com a solução crioprotetora. Ao passo que quando tratados com PVS2 a 25°C, essa resposta só era observada após 30 dias.

Após a transferência para meio MS0, tanto os brotos oriundos de ápices não resfriados (Figura 19a e 19b), como aqueles obtidos após a criopreservação (Figura 19c e 19d) apresentaram desenvolvimento normal, com alongamento do eixo caulinar e radicular.

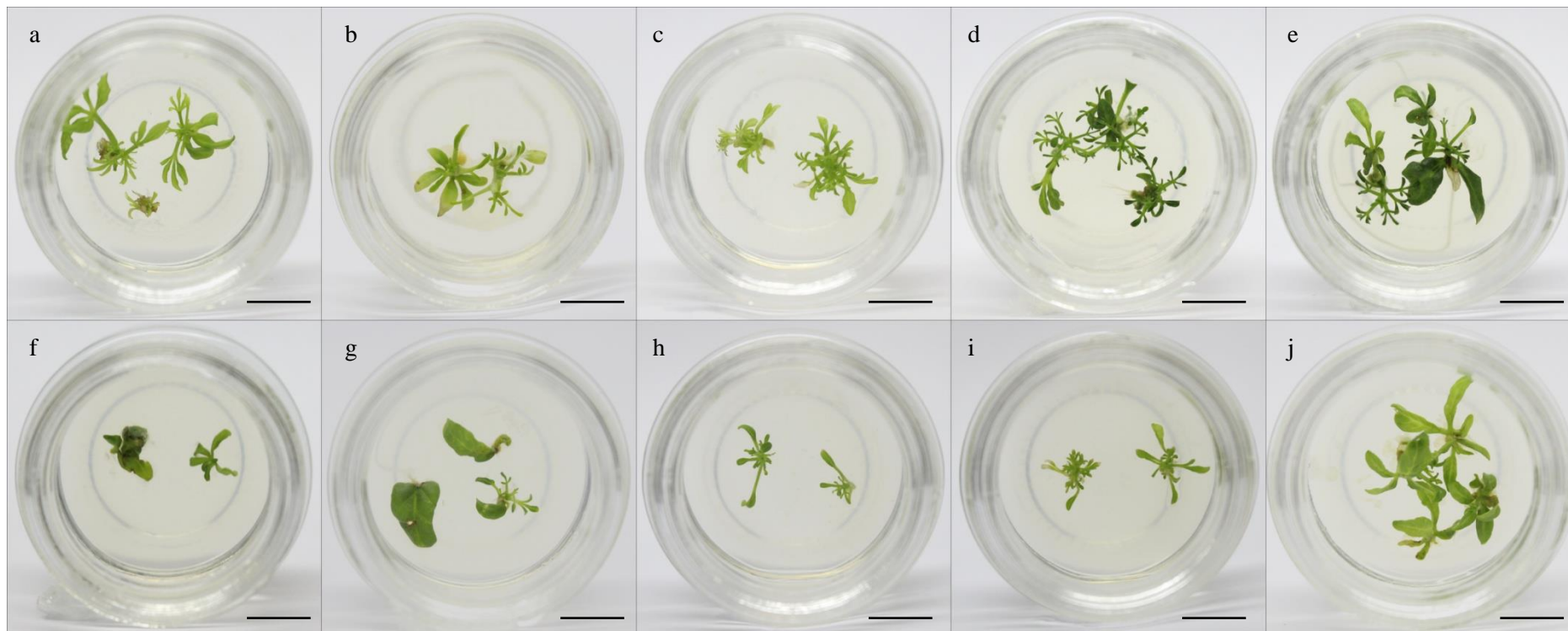
Tabela 5 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* pela técnica de V-Crioplaca utilizando suplementação do meio de recuperação com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.

Temperatura de exposição à PVS2	Tempo de exposição à PVS2 (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
		- NL	+ NL	- NL	+ NL
25°C	0	100±0,0 ^a	0 ^d	100±0,0 ^a	0 ^e
	15	100±0,0 ^a	3,3±3,3 ^d	100±0,0 ^a	0 ^e
	30	96,7±3,3 ^a	10±0,0 ^{cd}	93,3±3,3 ^{ab}	10,0±0,0 ^d
	45	93,3±3,3 ^{ab}	23,3±3,3 ^{bc}	90,0±0,0 ^{ab}	23,3±3,3 ^{cd}
	60	93,3±3,3 ^{ab}	40,0±5,7 ^b	90,0±0,03 ^{ab}	36,6±3,3 ^b
	90	83,3±3,3 ^b	33,3±3,3 ^b	80,0±5,7 ^b	33,3±3,3 ^{bc}
0°C	0	100±0,0 ^a	0 ^d	100±0,0 ^a	0 ^e
	15	100±0,0 ^a	3,3±3,3 ^d	100±0,0 ^a	0 ^e
	30	100±0,0 ^a	16,6±3,3 ^c	100±0,0 ^a	13,3±3,3 ^d
	45	100±0,0 ^a	46,6±3,3 ^b	96,7±3,3 ^a	40,0±0,0 ^b
	60	96,7±3,3 ^a	63,3±3,3 ^{ab}	93,3±3,3 ^{ab}	56,6±3,3 ^a
	90	96,7±3,3 ^a	76,6±6,6 ^a	93,3±3,3 ^{ab}	66,6±3,3 ^a

Os dados representam média ± erro padrão.

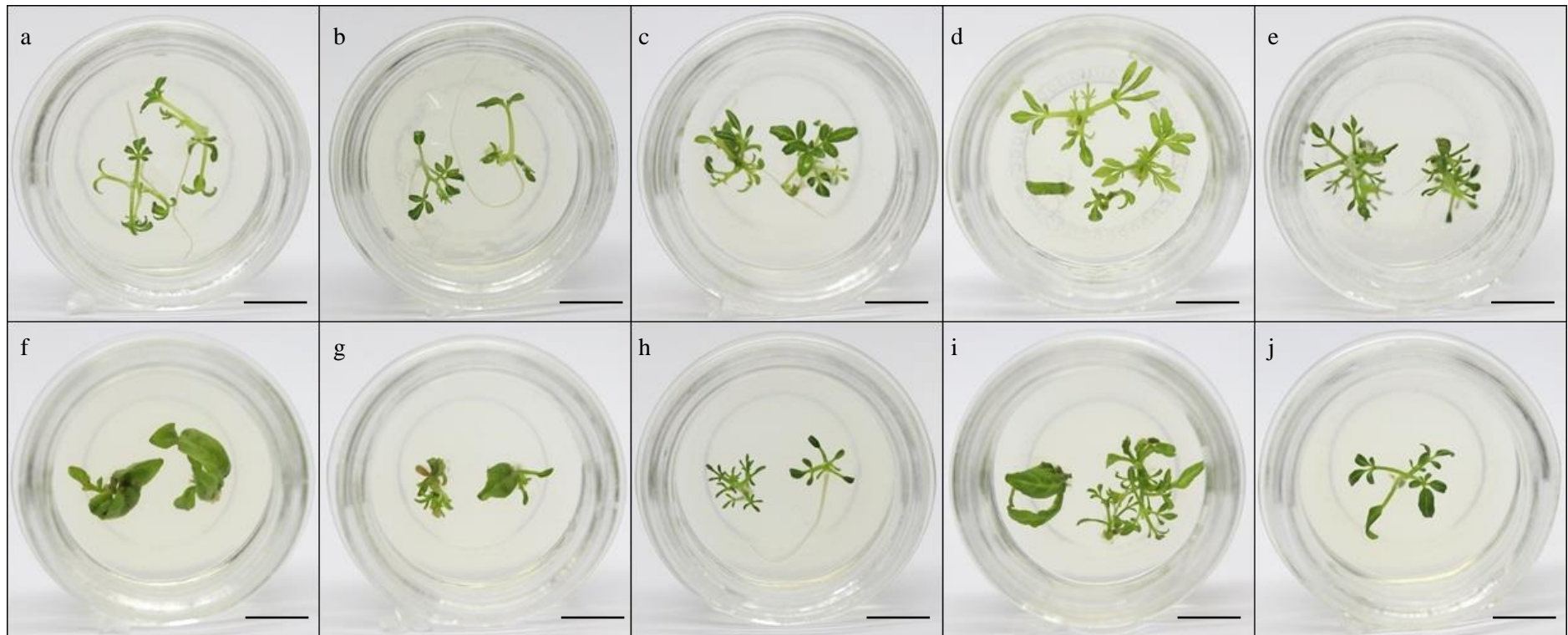
Letra iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 17 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 25°C e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.



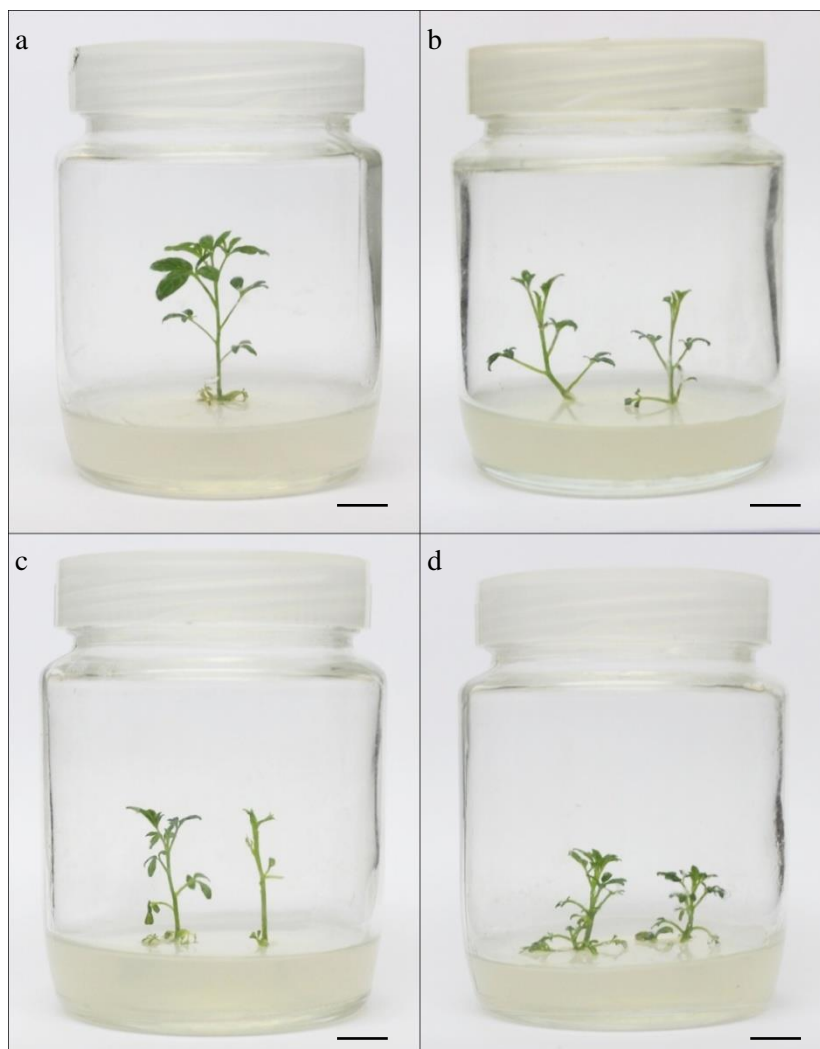
Legenda: Exposição por 15 (a, f); 30 (b, g); 45 (c, h); 60 (d, i); 90 minutos (e, j). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os ápices imersos em NL. Barras = 1 cm.

Figura 18 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 a 0°C e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.



Legenda: Exposição por 15 (a, f); 30 (b, g); 45 (c, h); 60 (d, i); 90 minutos (e, j). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os ápices imersos em NL. Barras = 1 cm.

Figura 19 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca após exposição à solução PVS2 (0°C) e posterior recuperação em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.



Legenda: Recuperação após 60 dias da exposição a solução crioprotetora por 60 (a, c) e 90 min (b, d). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os imersos em NL.
Barras = 1 cm

Os resultados de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca constituem o artigo "Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of the medicinal species *Cleome spinosa* (Cleomaceae) applying vitrification-based techniques", publicado no periódico CryoLetters (Apêndice).

4.2. Criopreservação por D-Crioplaca

4.2.1. Estabelecimento do pré-cultivo de ápices caulinares

O cultivo de ápices caulinares de *C.spinosa* em meio MS contendo altas concentrações de sacarose resultou na redução progressiva do teor hídrico do material (Tabela 6). Foram alcançadas taxas de até 37% de conteúdo hídrico residual para o pré-cultivo em concentrações crescentes de sacarose utilizando 0,5 M por 24 h e 0,75 M por 24 h.

O aumento da concentração de sacarose não afetou a capacidade de regeneração dos ápices (Tabela 6). Todos os tratamentos avaliados resultaram em taxas de regeneração de 100% após 30 dias de cultivo em meio MS enriquecido com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP.

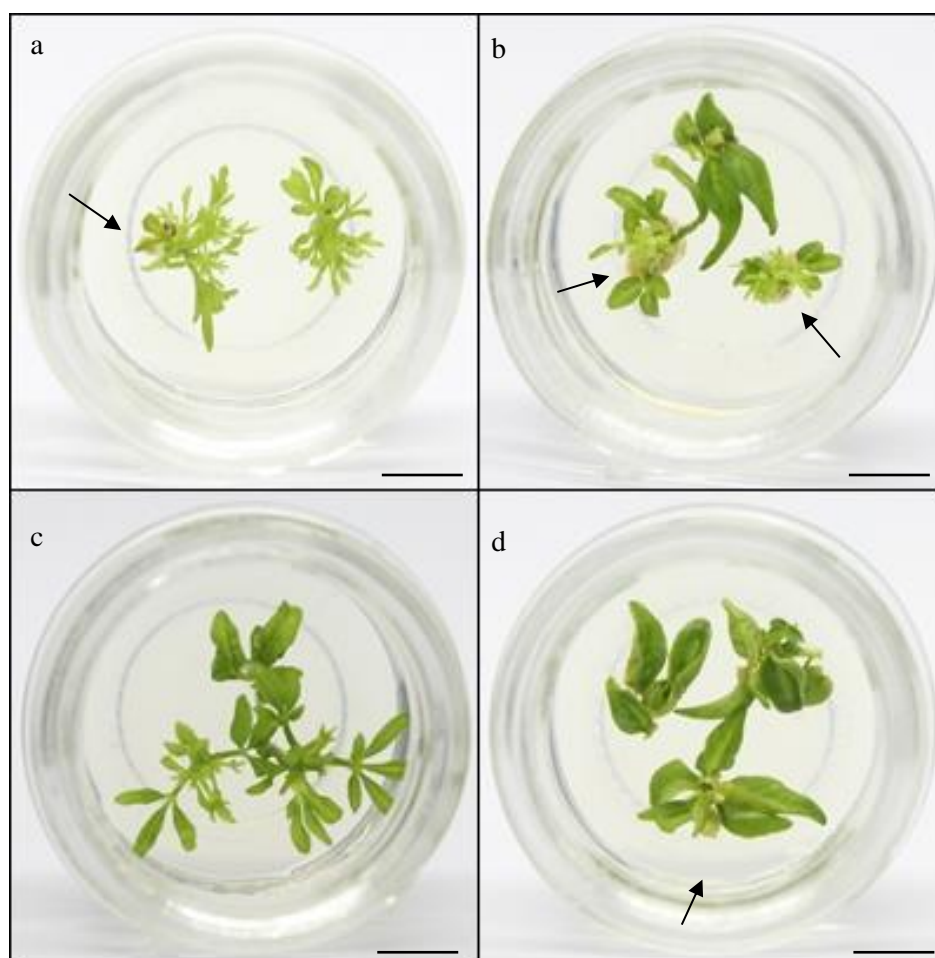
Entretanto, a exposição às altas concentrações de sacarose acarretou em algumas alterações fisiológicas nos brotos regenerados. O pré-cultivo dos ápices por 48 h em 0,3 M resultou na formação de brotos com o desenvolvimento de folhas pequenas (Figura 20a). O tratamento por 48 h em 0,5 M e aquele em concentrações crescentes de sacarose utilizando 0,5 M por 24 h e 0,75 M por 24 h, acarretaram no aparecimento de brotos com características de hiperhidricidade (Figura 20b e 20d). Também foi possível observar a formação de calos na base de alguns brotos regenerados a partir de ápices submetidos aos pré-tratamentos citados acima (Figura 20b).

Tendo em vista os resultados obtidos, a exposição dos ápices em concentrações crescentes de sacarose utilizando 0,25 M por 24 h e 0,5 M por 24 h, foi selecionada para a etapa de pré-cultivo. Esta foi a condição que apresentou uma maior redução do conteúdo hídrico associada a um aspecto fenotípico normal.

Tabela 6 - Determinação do teor hídrico e da taxa de regeneração de ápices caulinares de *C. spinosa* cultivados em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose, após 30 dias de cultivo em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP.

Pré-tratamento (M)		Teor Hídrico (%)	Taxa de regeneração (%)
Dia 1 (24 h)	Dia 2 (24h)		
0,3	0,3	63,32	100
0,5	0,5	49,93	100
0,25	0,5	56,20	100
0,5	0,75	37,53	100

Figura 20 - Respostas regenerativas de ápices caulinares de *C. spinosa* após pré-cultivo em meio MS enriquecido com altas concentrações de sacarose.



Legenda: 0,3 M por 48 h (a); 0,5 M por 48 h (b); 0,25 M (24 h) - 0,5 M (24 h) (c); 0,5 M (24 h) - 0,75 M (24 h) (d). As setas indicam a formação de calos. Barras = 1 cm.

4.2.2. Avaliação do tempo de exposição à sílica gel

O efeito do pré-cultivo com 0,25 M - 0,5 M de sacarose associado ao tratamento com a solução de *loading* e ao tempo de exposição à sílica gel, foi avaliado quanto ao teor hídrico residual e à capacidade regenerativa dos ápices. A associação do pré-cultivo com a exposição à solução de *loading* por 20 minutos resultou em um teor hídrico de 51% e taxa de regeneração de 100% em meio MS suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP por 30 dias (Tabela 7).

A associação de pré-cultivo ao *loading* e à exposição à sílica gel acarretou na redução do teor hídrico de forma proporcional ao tempo de exposição à sílica gel, resultando em valores que variaram de 49% (30 min) a 10% (180 min) (Tabela 7).

A taxa de regeneração também foi afetada pelo tempo de exposição à sílica gel (Tabela 7). Conforme houve o aumento do período de exposição, ocorreu a diminuição da taxa regenerativa dos ápices. O material tratado por 30 min apresentou desenvolvimento normal (Figura 21a), alcançando uma taxa de regeneração de 100%. Ápices expostos à sílica por 60 e 90 min desenvolveram plantas com aspecto normal, embora de tamanho um pouco menor quando comparadas àquelas obtidas pelo tratamento por 30 min (Figura 21b e 21c), apresentando taxa de regeneração de 70%. Já os ápices dessecados em sílica por longos períodos (120, 150 e 180 min), alcançaram taxas de regeneração inferiores a 30%. Esses materiais apresentaram tamanho diminuto e não se desenvolveram adequadamente (Figura 21d-21f).

Considerando os resultados obtidos nesta etapa, para dar prosseguimento aos experimentos de D-Crioplaca, foram selecionados os tempos de exposição à sílica gel por 30, 60 e 90 minutos.

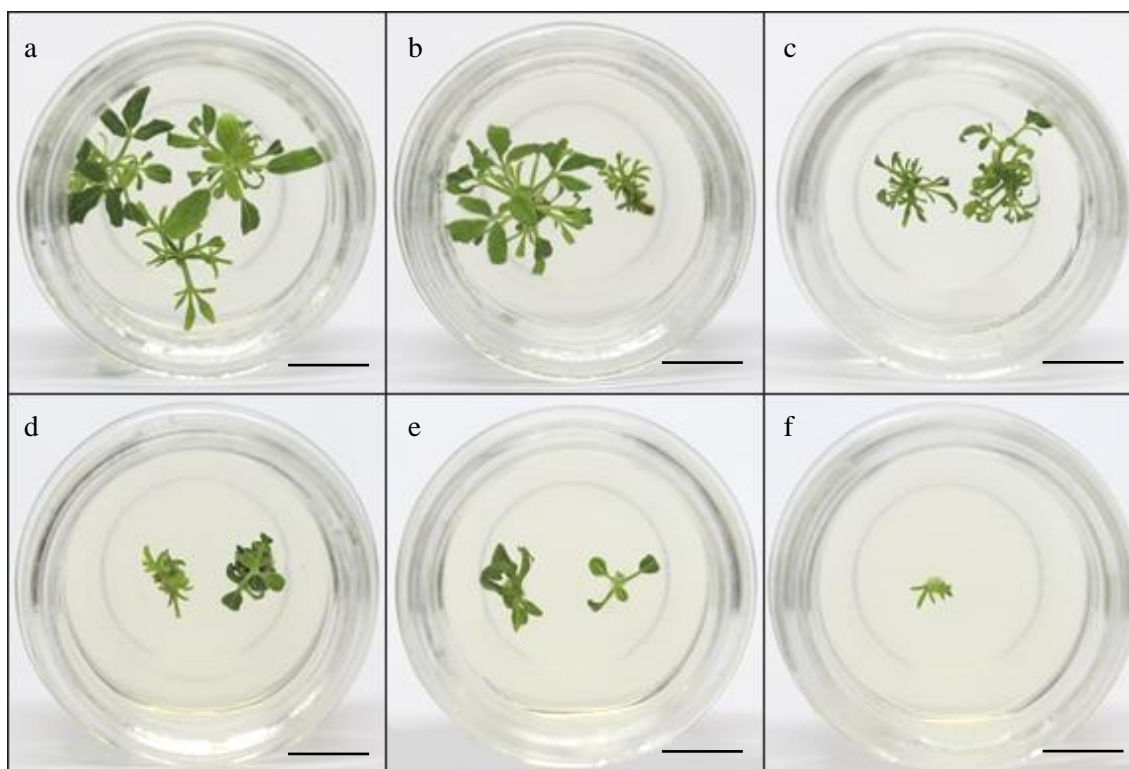
Tabela 7 - Determinação do teor hídrico e da taxa de regeneração de ápices caulinares de *C. spinosa* expostos à solução de *loading* seguido pela dessecação em sílica gel por diferentes períodos de tempo.

Tempo de dessecação em sílica gel (min)	Teor hídrico (%)	Taxa de regeneração* (%)
0	51,32	100
30	49,14	100
60	39,46	70
90	21,63	70
120	16,34	30
150	11,40	20
180	10,54	10

Ápices pré-cultivados por 48 h em meio MS com concentrações crescentes de sacarose (0,25 M - 0,5M) e expostos à solução de *loading* por 20 minutos.

* Ápices cultivados em meio MS + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP após a exposição à sílica gel.

Figura 21 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de *C. spinosa* expostos à sílica gel por diferentes períodos de tempo e posterior recuperação em meio MS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP por 30 dias.



Legenda: Exposição por 30 min (a); 60 min (b); 90 min (c); 120 min (d); 150 min (e); 180 min (f).
Barras = 1 cm

4.2.3 Criopreservação e recuperação

Foi avaliada a associação de todas as etapas anteriores, seguida de imersão ou não em nitrogênio líquido, com posterior exposição à solução de *unloading*. Na etapa de recuperação, os ápices foram inoculados em meio de recuperação contendo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP por 30 dias.

O tempo de dessecação em sílica gel não influenciou as taxas de sobrevivência e recuperação para ápices não imersos em NL (Tabela 8). Para estes materiais, foram encontrados valores de até 96% e 90% para sobrevivência e recuperação, respectivamente, quando expostos à sílica por 60 min.

Já para os ápices criopreservados, o tempo de exposição à sílica se mostrou um parâmetro que interferiu diretamente na resposta *in vitro* (Tabela 8). Ápices dessecados por 30 e 90 min alcançaram baixas taxas de sobrevivência e recuperação, não ultrapassando 13% e 10%, respectivamente. Entretanto, a exposição do material por 60 min à sílica gel resultou em taxas de 40%, tanto para sobrevivência como para recuperação.

O tempo de dessecação em sílica também influenciou no desenvolvimento das plantas após a criopreservação. Ápices tratados com sílica por 30 minutos originaram pequenos brotos com o aparecimento de algumas folhas de dimensões maiores que o normal e que destoavam do tamanho dos brotos (Figura 22a). Os brotos oriundos de ápices dessecados por 60 min apresentaram aspecto fenotípico normal com início de enraizamento ainda nos primeiros 30 dias após a criopreservação (Figura 22b). Já os ápices expostos à sílica por 90 min deram origem a brotos pequenos e com aspecto hiperhídrico. Além disso, alguns brotos apresentaram apenas o desenvolvimento de folhas de grandes dimensões e a formação de calos na base (Figura 22c).

O efeito do tempo de exposição à sílica gel também pôde ser observado nas respostas morfogênicas após a transferência para meio MS0. Ápices não imersos em NL apresentaram desenvolvimento normal dos eixos caulinar e radicular, independentemente do tempo de exposição à sílica gel (Figura 23a-c). Porém, aqueles imersos em NL e dessecados por 30 e 90 min não se desenvolveram adequadamente, mesmo 60 dias após a criopreservação (Figura 23d e 23f). Por outro lado, ápices resfriados e tratados com sílica gel por 60 min, apresentaram desenvolvimento normal (Figura 23e).

A fim de otimizar o processo de criopreservação pela técnica de D-Crioplaca, foram realizados novos experimentos nos quais foram avaliados: o efeito da manutenção da

concentração de sacarose na solução de *loading* (0,4 M) associada com o aumento do tempo de exposição a esta solução para 40 minutos; e o efeito do aumento da concentração de sacarose na solução de *loading* (0,8 M) com a manutenção do tempo de exposição (20 minutos). Além disso, também foi avaliado o efeito do aumento na concentração de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) para 0,6 M, seguido da exposição à solução de *loading* padrão (0,4 M sacarose + 2,0 M de glicerol) por 20 minutos.

Para os ensaios visando o aumento do tempo de exposição ao *loading*, ápices pré-cultivados, expostos ao *loading*, imersos ou não em NL, resultaram em 100% de sobrevivência (Tabela 8). Embora o tratamento apenas com solução de *loading* tenha resultado em 46% de recuperação após a imersão em NL, as plantas oriundas deste tratamento não se desenvolveram adequadamente (Figura 25e).

Para os ápices dessecados em sílica gel, conforme houve um aumento do tempo de exposição, ocorreu a diminuição das taxas de sobrevivência e recuperação dos materiais não imersos em NL. Os maiores percentuais de sobrevivência e recuperação encontrados foram de 100% e 76% para 30 min e os menores de 56% e 43% para 90 min, respectivamente. Com relação aos ápices imersos em NL, as taxas de sobrevivência e recuperação não diferiram estatisticamente. Para esses materiais, foram alcançados valores na faixa de 20%, independentemente do tempo de dessecação em sílica gel (Tabela 8).

O aumento do tempo de exposição à solução de *loading* também exerceu efeito no aspecto morfológico dos materiais após as etapas de criopreservação. De um modo geral, os brotos desenvolvidos após esses tratamentos apresentaram eixo caulinar e folhas de tamanho diminuto (Figura 24a-24h). Além disso, frequentemente foi possível observar a formação de folhas com aspecto vitrificado, principalmente para o material oriundo de ápices imersos em NL (Figura 24d, 24g, 24e). Os brotos, quando possível, foram individualizados e transferidos para meio MS0. Aqueles desenvolvidos a partir do material não imerso em NL resultaram em plantas com aspecto fenotípico normal (Figuras 25a-25d). Entretanto, para o material resfriado em NL (Figuras 25e-25h), apenas aqueles oriundos da exposição por 30 min a sílica gel apresentaram desenvolvimento *in vitro*.

Nos ensaios empregando a solução de *loading* contendo o dobro da concentração de sacarose (0,8 M) pelo tempo de exposição de 20 min, ápices pré-cultivados, mas não imersos em NL, apresentaram 76% de sobrevivência e 66% de recuperação. Por outro lado, o material imerso em NL, não sobreviveu após o reaquecimento (Tabela 8).

Para ápices dessecados em sílica gel, conforme houve um aumento do tempo de exposição a este agente, ocorreu a diminuição da capacidade de regeneração dos materiais não imersos em NL. Sendo os maiores percentuais de sobrevivência (80%) e recuperação (73%) alcançados após 30 min de dessecação. Enquanto para os materiais imersos em NL, a dessecação em sílica por 60 min resultou nas maiores taxas de sobrevivência (23%) e recuperação (16%) (Tabela 8).

A exposição à solução de *loading* com maior concentração de sacarose não influenciou o aspecto morfológico dos brotos gerados a partir de ápices não imersos em NL (Figura 26a-26c). Entretanto, quando os ápices foram resfriados em NL, ocorreu a formação de brotos de tamanho reduzido, sendo observado o desenvolvimento de folhas anormais, com aspecto hiperhídrico (Figuras 26d-26f).

Tabela 8 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* pela técnica de D-Crioplaca utilizando a solução de *loading* com diferentes concentrações de sacarose e tempos de exposição.

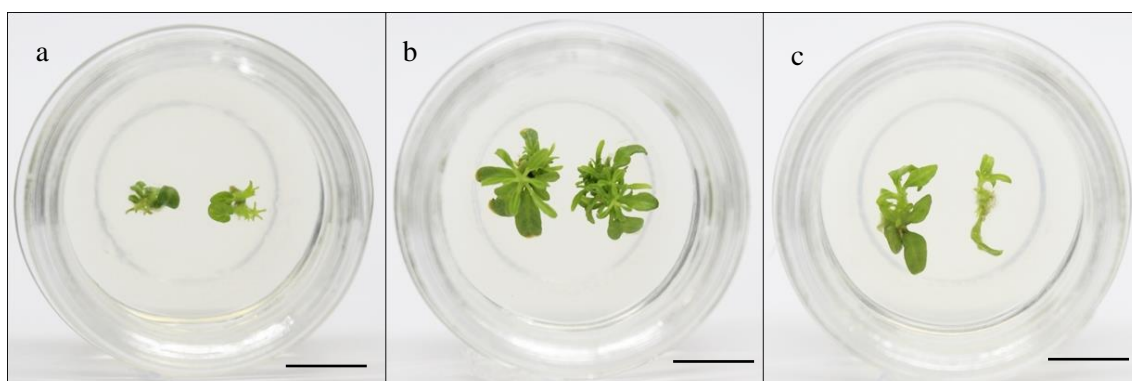
Tempo de dessecação em sílica	<i>Loading</i> (0,4 M sacarose / 20 min)				<i>Loading</i> (0,4 M sacarose / 40 min)				<i>Loading</i> (0,8 M sacarose / 20 min)			
	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)		Sobrevivência (%)		Recuperação (%)		Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
	- NL	+NL	- NL	+NL	- NL	+NL	- NL	+NL	- NL	+NL	- NL	+NL
	0	100±0,0 ^a	0 ^b	100±0,0 ^a	0 ^b	100±0,0 ^a	100±0,0 ^a	90,0±5,7 ^a	46,6±3,3 ^a	76,7±3,3 ^a	0,0±0,0 ^c	66,7±3,3 ^a
30	96,7±3,3 ^a	6,3±3,3 ^b	83,3±3,3 ^a	3,3±3,3 ^b	100±0,0 ^a	26,6±3,3 ^b	76,7±6,6 ^{ab}	20,0±0,0 ^b	80,0±0,0 ^a	13,3±3,3 ^b	73,3±3,3 ^a	6,6±3,3 ^b
60	96,7±3,3 ^a	40,0±5,7 ^a	90,0±5,7 ^a	40,0±5,7 ^a	83,3±3,3 ^b	23,3±8,8 ^b	66,7±3,3 ^b	13,3±3,3 ^b	73,3±3,3 ^a	23,3±3,3 ^a	70,0±0,03 ^a	16,6±3,3 ^a
90	80,0±5,7 ^a	13,3±3,3 ^b	80,0±5,7 ^a	10±0,0 ^b	56,7±3,3 ^c	23,3±3,3 ^b	43,3±3,3 ^c	10,0±0,0 ^b	63,3±3,3 ^b	20,0±0,0 ^{ab}	53,3±3,3 ^b	6,6±3,3 ^b

A recuperação foi realizada em meio MS acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.

Os dados representam média ± erro padrão.

Letra iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos (p≤0,05) pelo teste de Tukey

Figura 22 - Respostas morfológicas de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca e posterior recuperação em meio MS com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, por 30 dias.



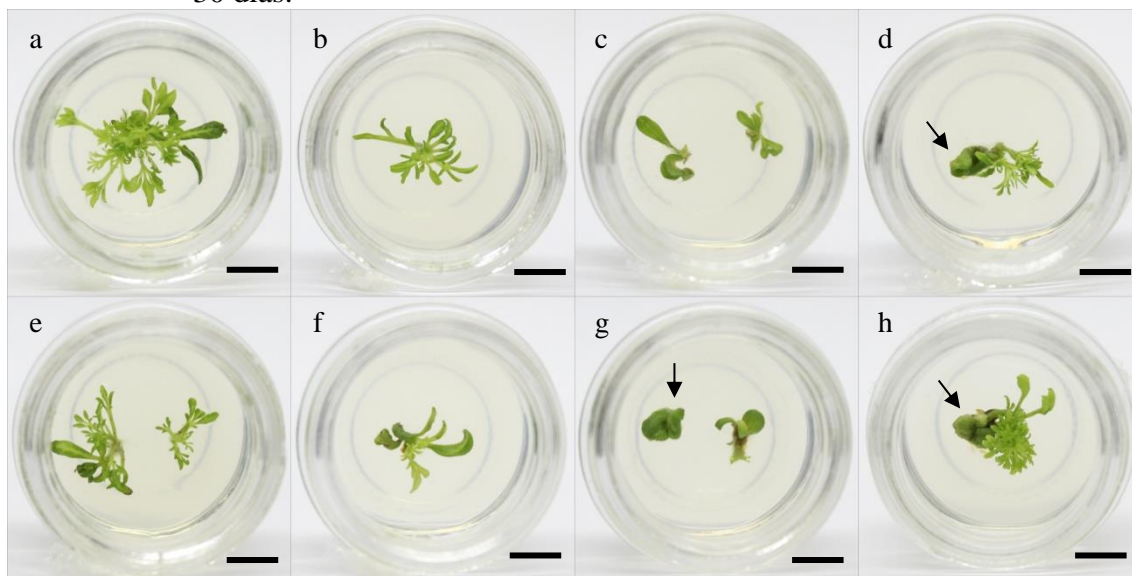
Legenda: Ápices expostos à sílica gel por 30 (a); 60 (b); 90 min (c). Barras = 1 cm.

Figura 23 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, após 60 dias do tratamento de dessecação em sílica gel.



Legenda: Exposição por 30 (a, d); 60 (b, e); 90 minutos (c, f). A fileira superior indica a recuperação a partir de ápices não imersos em NL e a inferior representa os imersos em NL. Barras = 1 cm.

Figura 24 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 40 min de exposição à solução de *loading* e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.



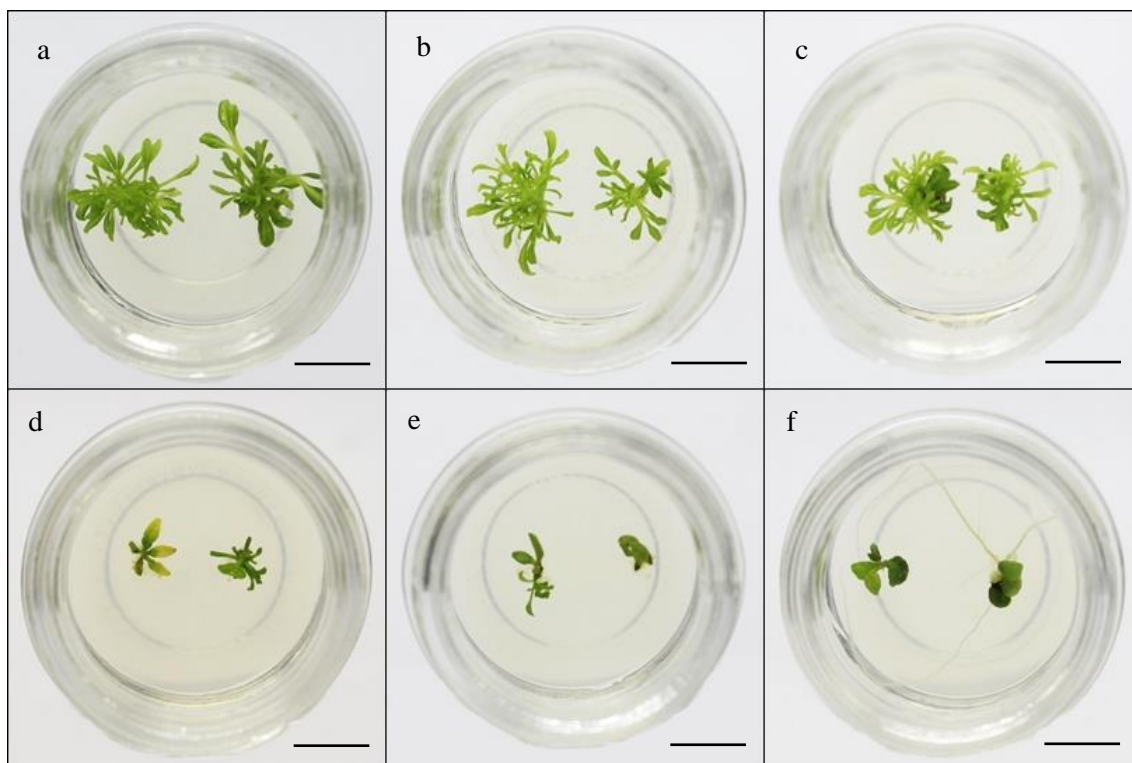
Legenda: Exposição à sílica gel por 0 (a, e); 30 (b, f); 60 (c, g); 90 minutos (d, h). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os imersos em NL. As setas indicam a presença de folhas com aspecto vitrificado. Barras = 1 cm

Figura 25 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 40 min de exposição à solução de *loading* e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 60 dias.



Legenda: Exposição à sílica gel por 0 (a, e); 30 (b, f); 60 (c, g); 90 minutos (d, h). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os imersos em NL. Barras = 1 cm

Figura 26 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando solução de *loading* contendo 0,8 M de sacarose por um tempo de exposição de 20 minutos e recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.



Legenda: Exposição à sílica gel por 30 (a, d); 60 (b, e); 90 minutos (c, f). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os imersos em NL.
Barras = 1 cm

Quando a concentração de sacarose nas soluções de polimerização foi elevada para 0,6 M, os ápices pré-cultivados e expostos ao *loading*, alcançaram taxas de sobrevivência e recuperação de 96% e 90%, respectivamente. Entretanto, quando esse material foi imerso em NL, foi possível observar apenas 6% de sobrevivência (Tabela 9).

Para os ápices dessecados em sílica gel, conforme houve um aumento do tempo de exposição a este agente, ocorreu a diminuição da taxa de sobrevivência e recuperação dos materiais não imersos em NL. Sendo os maiores percentuais de sobrevivência (100%) e recuperação (93%) obtidos após 30 min de dessecação (Tabela 9).

Por outro lado, o aumento da concentração de sacarose nas soluções de polimerização se mostrou uma condição favorável para a criopreservação dos ápices caulinares de *C. spinosa* por D-Crioplaca. Ápices aderidos às Crioplacas com essa solução, dessecados em sílica gel por 60 min e imersos em NL, alcançaram taxas de 86% de sobrevivência e 56% de recuperação (Tabela 9). As plantas desenvolvidas após esses tratamentos apresentaram aspecto fenotípico normal, com desenvolvimento adequado de folhas e do eixo caulinar tanto para os ápices submetidos à condição controle, como para aqueles que foram resfriados em NL (Figura 27a-27h). Após a transferência para meio MS0, tanto os brotos oriundos de ápices não resfriados (Figura 28a), como aqueles criopreservados apresentaram desenvolvimento normal. As maiores porcentagens de recuperação foram alcançadas após dessecação em sílica gel por 60 minutos (Figura 28b). As plantas desenvolvidas a partir desses ápices alongaram, apresentaram a formação de raízes (Figura 28c) e mantiveram a capacidade de multiplicação *in vitro* após o processo de criopreservação.

Tendo em vista os resultados alcançados com o aumento da concentração de sacarose nas soluções de polimerização, um novo experimento foi realizado mantendo essa condição, porém alterando o tempo de recuperação na presença de 0,5 mg.L⁻¹ BAP para 15 dias.

Os ápices pré-cultivados e expostos ao *loading*, alcançaram taxas de sobrevivência e recuperação de 96% e 90%, respectivamente. Entretanto, quando esse material foi imerso em NL, foi possível observar apenas 6% de sobrevivência (Tabela 9).

Para os ápices dessecados em sílica gel, o aumento do tempo de exposição ao agente não resultou em diferença significativa quanto a sobrevivência dos materiais não imersos em NL. Entretanto, a exposição à sílica por 90 minutos acarretou em uma redução significativa do percentual de recuperação desses materiais (Tabela 9).

A associação do aumento da concentração de sacarose nas soluções de polimerização com a redução do tempo de cultivo em meio de recuperação para 15 dias, se mostrou a condição mais favorável para a criopreservação dos ápices caulinares de *C. spinosa* por D-Crioplaca. Ápices dessecados em sílica gel por 60 min e imersos em NL, alcançaram taxas de 76% de sobrevivência e 70% de recuperação (Tabela 9). As plantas desenvolvidas após esse tratamento apresentaram aspecto fenotípico normal, com desenvolvimento adequado de folhas e do eixo caulinar tanto para os ápices submetidos à condição controle, como para aqueles que foram resfriados em NL (Figura 29a-29h). Após a transferência para meio MS0, tanto os brotos oriundos de ápices não resfriados (Figura 30a), como aqueles obtidos após a criopreservação (Figura 30b) apresentaram desenvolvimento normal. Essas plantas alongaram, apresentaram formação de raízes (Figura 30c) e mantiveram a capacidade de multiplicação *in vitro* após a criopreservação.

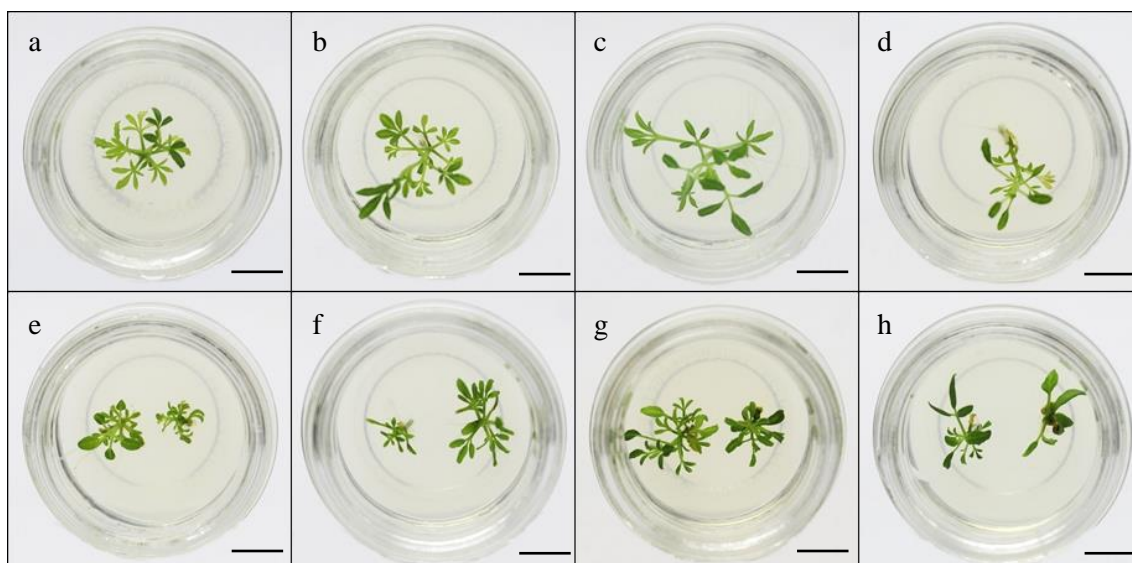
Tabela 9 - Criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* pela técnica de D-Crioplaca utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP.

Tempo de dessecação em sílica	Recuperação - Meio MS + 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP							
	30 dias				15 dias			
	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)		Sobrevivência (%)		Recuperação (%)	
	- NL	+NL	- NL	+NL	- NL	+NL	- NL	+NL
0	96,7±3,3 ^a	6,6±3,3 ^c	90,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^c	96,7±6,6 ^a	6,6±3,3 ^c	90,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^c
30	100±0,0 ^a	50,0±5,7 ^b	93,3±3,3 ^a	30,0±5,7 ^b	96,7±3,3 ^a	56,6±3,3 ^b	93,3±3,3 ^a	33,3±3,3 ^b
60	93,3±3,3 ^a	86,6±3,3 ^a	80,0±5,7 ^a	56,6±3,3 ^a	96,7±3,3 ^a	76,3±3,3 ^a	90,0±0,0 ^a	70,0±5,7 ^a
90	73,3±3,3 ^b	56,6±8,8 ^b	60,0±0,0 ^b	33,3±3,3 ^b	86,7±3,3 ^a	46,6±3,3 ^b	80,0±5,7 ^b	33,3±6,6 ^b

Os dados representam média ± erro padrão.

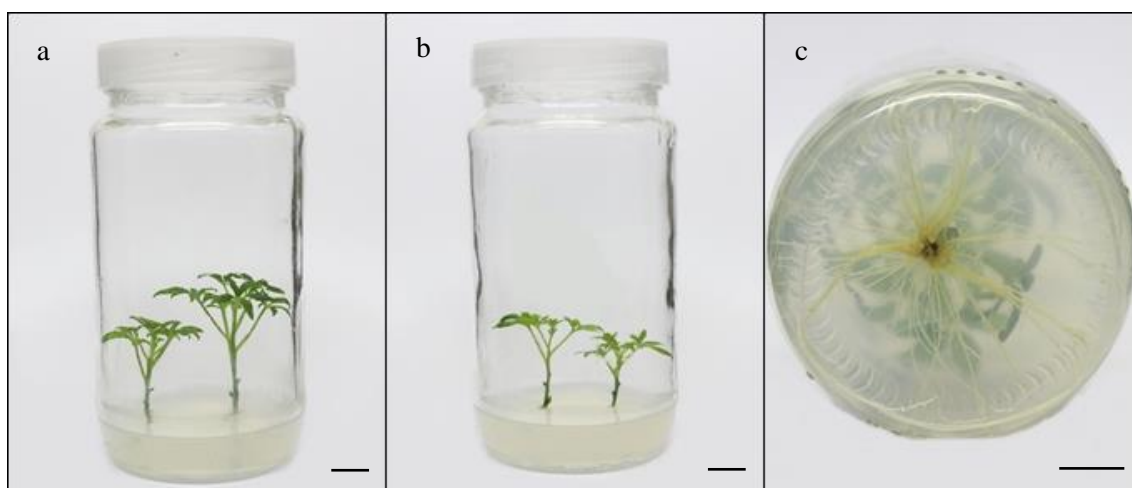
Letra iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos (p≤0,05) pelo teste de Tukey

Figura 27 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.



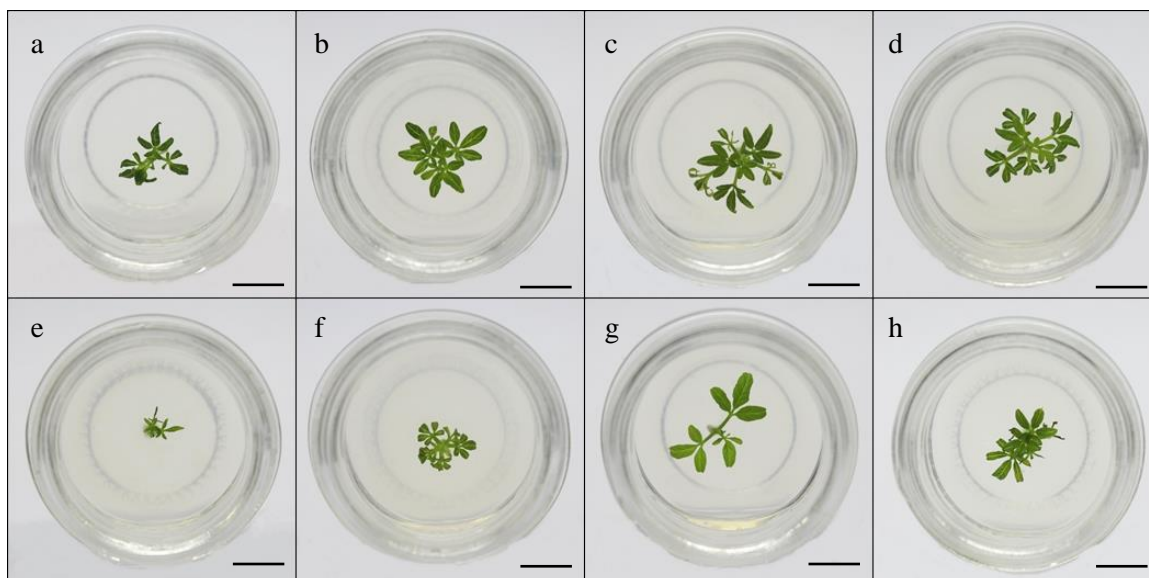
Legenda: Exposição à sílica gel por 0 (a, e); 30 (b, f); 60 (c, g); 90 minutos (d, h). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os imersos em NL. Barras = 1 cm

Figura 28- Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.



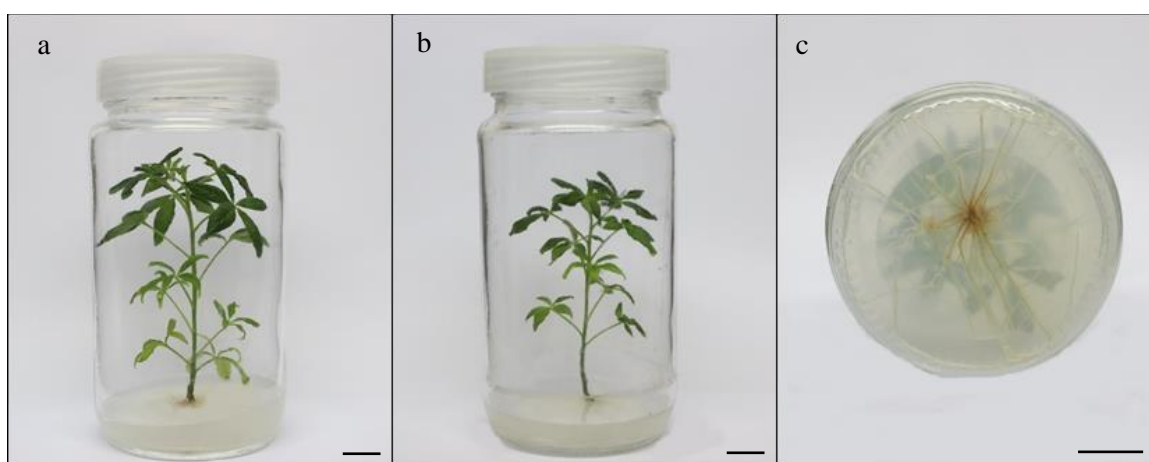
Legenda: Recuperação sem imersão em NL após 60 dias (a); Recuperação com imersão em NL após 60 dias (b); Detalhe do desenvolvimento de raízes após 60 dias da criopreservação (c). Barras = 1 cm.

Figura 29 - Desenvolvimento de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 15 dias.



Legenda: Exposição à sílica gel por 0 (a, e); 30 (b, f); 60 (c, g); 90 minutos (d, h). A fileira superior representa os ápices não imersos em NL e a inferior representa os imersos em NL. Barras = 1 cm.

Figura 30 - Plantas regeneradas a partir de ápices caulinares de *C. spinosa* criopreservados pela técnica de D-Crioplaca, utilizando 0,6 M de sacarose nas soluções de polimerização (alginato de sódio e cloreto de cálcio) e posterior recuperação em meio MS com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, por 30 dias.



Legenda: Recuperação sem imersão em NL após 60 dias (a); Recuperação com imersão em NL após 60 dias (b); Detalhe do desenvolvimento de raízes após 60 dias da criopreservação (c). Barras = 1 cm.

4.3 Aclimatização

Plantas, com cerca de quatro meses de idade, regeneradas a partir do processo de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca, foram transferidas para condições *ex vitro* (Figura 31a). O nível de umidade foi mantido elevado ao longo das duas primeiras semanas (cerca de 95%) e, conforme as campânulas foram perfuradas, foi gradualmente reduzida até se igualar com a umidade ambiente.

Foi alcançada uma taxa de aclimatização de 100% (Tabela 10) após 30 dias de cultivo *ex vitro* (Figura 31b), sendo essa taxa mantida após 60 dias (Figura 31c). As plantas aclimatizadas apresentaram uma variação de comprimento de cerca de 10 cm e, após 60 dias do início do processo, apresentavam mais do que o dobro da quantidade inicial de número de folhas (Tabela 10). As plantas aclimatizadas apresentaram aspecto fenotípico normal, sendo a taxa de abscisão foliar ao longo do processo bastante reduzida, se restringindo a uma ou duas folhas por planta.

As plantas regeneradas evoluíram para plantas saudáveis e ao final do terceiro mês sob condições *ex vitro*, foi possível observar o aumento da área foliar (Figura 31d).

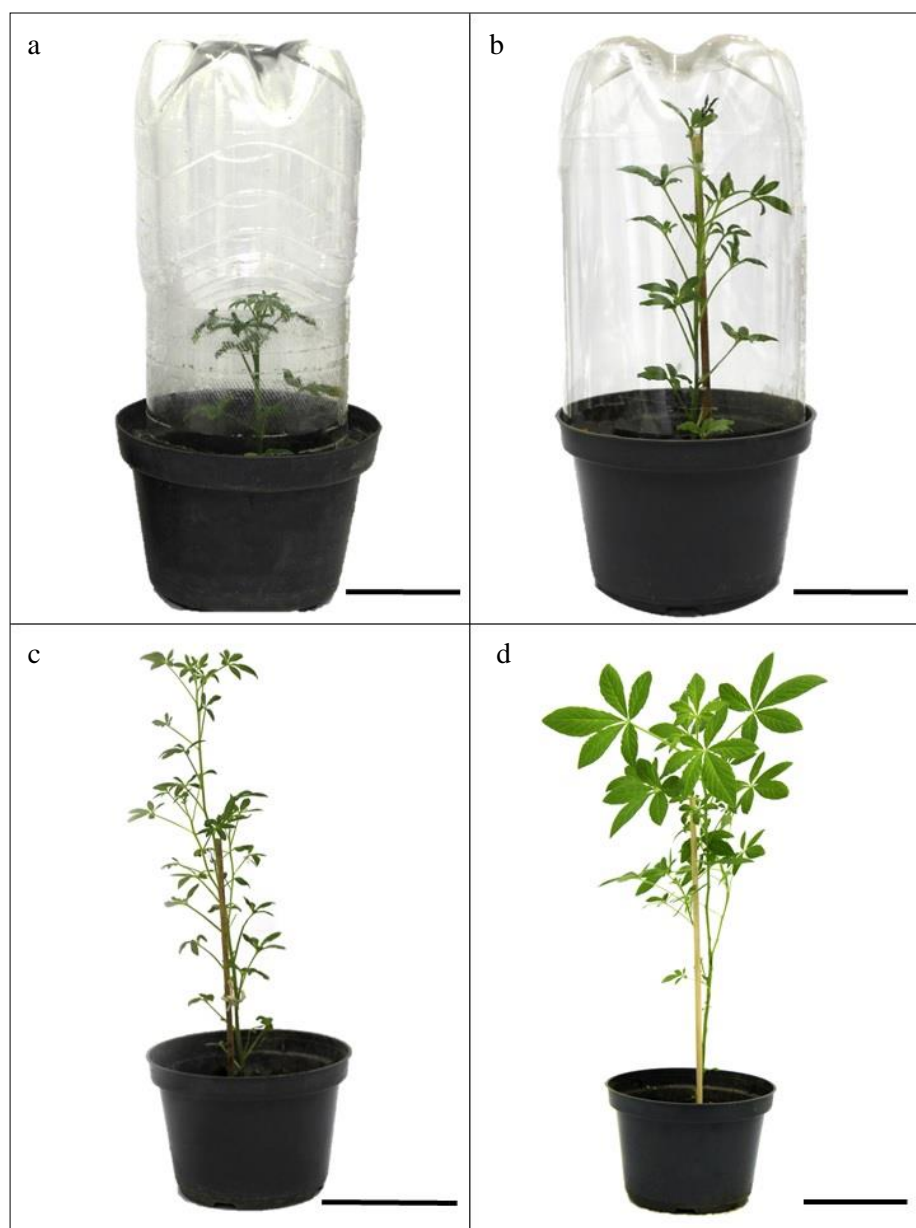
Tabela 10 - Altura média e número de folhas de plantas de *C. spinosa* ao longo do processo de aclimatização.

Tempo (dias)	Altura média (cm)	Número de folhas
0	10,8 ± 0,32 ^c	9,78 ± 0,32 ^c
30	15,6 ± 0,76 ^b	15,44 ± 1,2 ^b
60	21,7 ± 0,98 ^a	25, 11 ± 2,82 ^a

Os dados representam média ± erro padrão.

Letra iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey

Figura 31 - Aclimatização de plantas de *C. spinosa* regeneradas a partir dos processos de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca.



Legenda: Tempo 0 (a); 30 (b); 60 (c); e 90 dias (d). Barras = 10 cm.

4.4 Análise da estabilidade genética

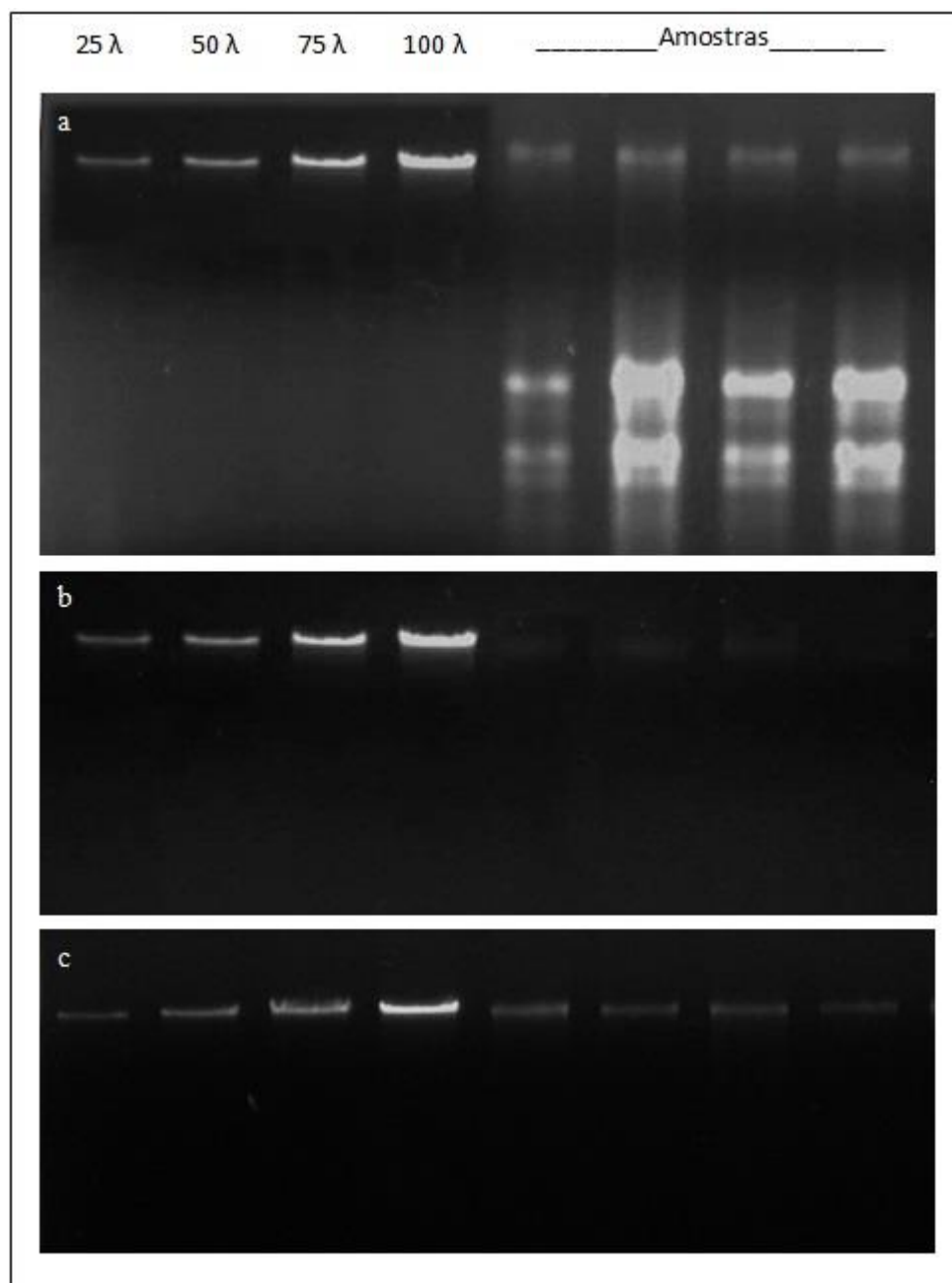
4.4.1 Extração e quantificação de DNA

Para determinar a metodologia mais adequada para a extração de DNA, inicialmente, foi avaliado o protocolo descrito por Lanza e colaboradores (1997), baseado no método de extração utilizando o detergente CTAB. Por este método foi obtido cerca de 12,5 ng de DNA/ μ L, conforme evidenciado na comparação visual com o DNA λ de referência. Além disso, foi possível observar a presença de rastros e duas bandas de fragmentos menores ao longo do gel, sugerindo que houve degradação do DNA, assim como a presença de RNA nas amostras (Figura 32a).

Tendo em vista que um dos objetivos de uma extração de DNA eficiente é a obtenção de uma amostra de boa qualidade para as reações de PCR, foi investigado outro protocolo o qual baseia-se no método de extração utilizando o detergente SDS (DELLAPORTA et al., 1983). Por este método foi obtido menos de 12,5 ng de DNA/ μ L, conforme evidenciado na figura 32b. Entretanto, o uso de RNase minimizou os rastros previamente observados quando empregado o protocolo de Lanza e colaboradores (1997).

Considerando os resultados alcançados, optou-se por investigar um protocolo de extração CTAB com modificações, que incluiu o uso de RNase e que tem sido indicado para espécies recalcitrantes para extração de DNA (HEALEY et al. 2014). A extração por este protocolo resultou, em média, 25 ng de DNA/ μ L, o dobro da concentração obtida anteriormente (Figura 32c). Além de se destacar pelo melhor resultado quantitativo, este protocolo foi o que apresentou maior qualidade na extração do DNA e, por estes motivos, foi selecionado para dar continuidade aos experimentos.

Figura 32 - Comparação de métodos de extração e quantificação do DNA genômico de *C. spinosa*.



Legenda: Extração segundo LANZA et al., 1997 (a); DELLAPORTA et al., 1983 (b); HEALEY et al., 2014 (c).

4.4.2 Análise pela técnica SCoT (*Start Codon Targeted Polymorphism*)

Inicialmente, quinze *primers* foram analisados quanto ao número de fragmentos reprodutíveis gerados como produtos de amplificação, utilizando Taq DNA polimerase a uma concentração de 1,5 U e empregando 50 °C como temperatura de anelamento. Dos 15 *primers* SCoT avaliados, 11 apresentaram produtos de amplificação, sendo possível observar a formação de um total de 32 fragmentos, os quais variaram de 500-2000 pb (Figura 33a).

Para confirmar a reprodutibilidade do método, os *primers* que apresentaram produtos de amplificação (1, 2, 3, 12, 13, 16, 17, 28, 32 e 33) foram avaliados utilizando-se o DNA extraído de duas plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa*. Os resultados demonstraram que a técnica se mostrou reprodutível, originando um padrão de bandas semelhantes àquele encontrado no ensaio inicial (Figura 33b).

Visando estabelecer as condições mais adequadas para a técnica SCoT, foram realizados experimentos com o objetivo de avaliar a temperatura de anelamento e a concentração da Taq DNA polimerase.

Para avaliar o efeito da temperatura de anelamento no padrão de bandas geradas pela amplificação, foram investigados apenas os *primers* que resultaram no menor número de bandas geradas após a amplificação nos ensaios iniciais (4, 5, 6, 7, 16, 17, 27, 32 e 33). A utilização da temperatura de anelamento de 48 °C resultou em um maior número de bandas amplificadas, principalmente para os *primers* 17, 32 e 33. Enquanto que na temperatura de 52 °C houve uma redução significativa na quantidade e qualidade das bandas (Figura 34).

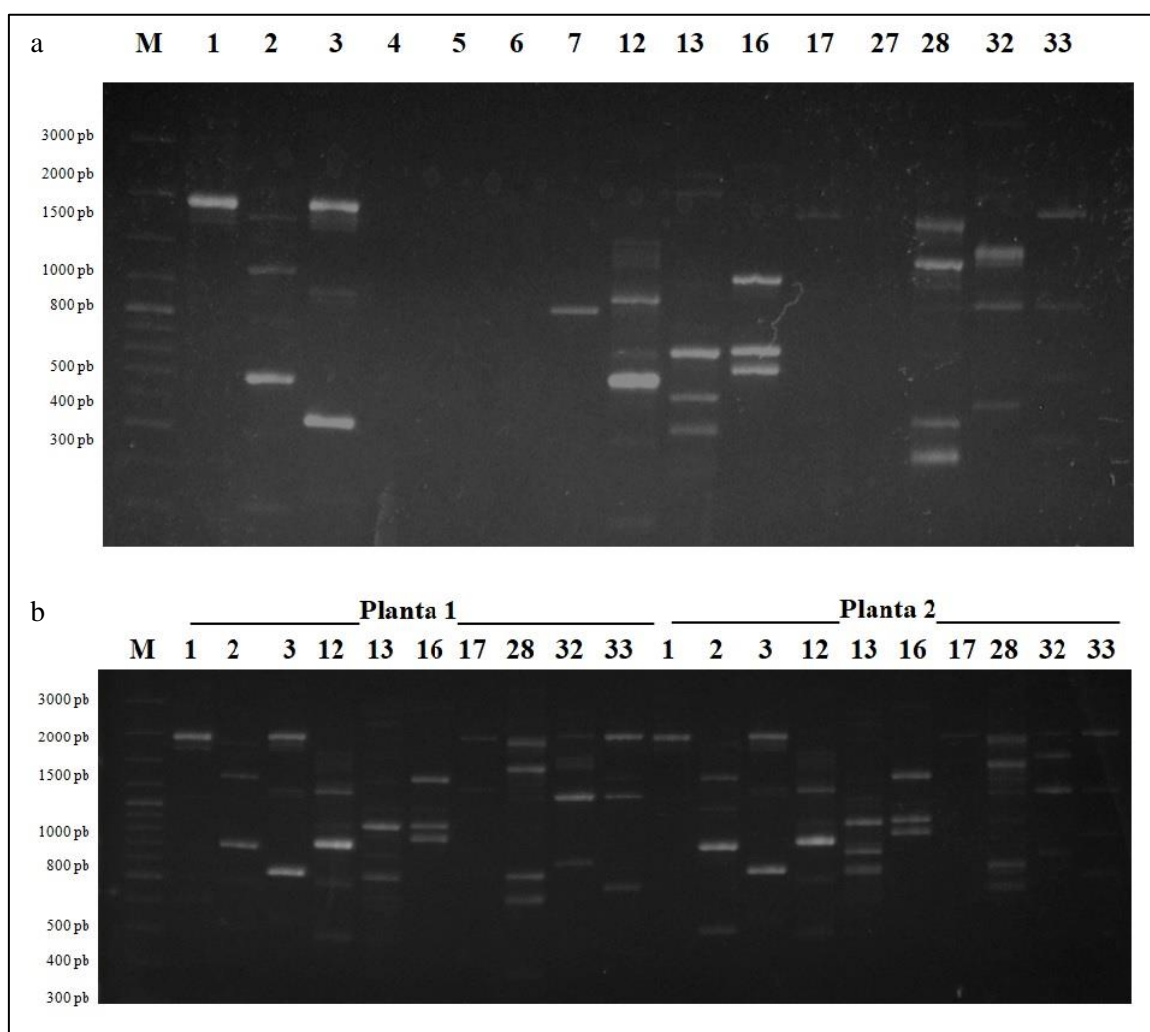
O aumento na concentração da Taq DNA polimerase para 2,5 U também foi avaliado. Para a reação, foram selecionados os *primers* que geraram um maior número de bandas nos ensaios iniciais (1, 2, 3, 12, 13 e 28). O aumento da concentração da enzima, possibilitou a visualização de bandas mais nítidas e, por esse motivo, optou-se por utilizar tal concentração nos experimentos seguintes (Figura 35).

Com base nos resultados obtidos, foi realizado um experimento associando o aumento da concentração da Taq DNA polimerase (2,5 U) com as temperaturas de anelamento que resultaram em um maior número de bandas (50 e 48°C). Conforme observado na figura 36 (a e b), as reações de amplificação resultaram em um total de 76 e 104 bandas utilizando-se as temperaturas de anelamento a 50°C e 48°C, respectivamente.

A reação utilizando 48°C se mostrou mais eficaz para a maioria dos *primers* avaliados, sendo selecionada para a realização dos ensaios SCoT (Tabela 11).

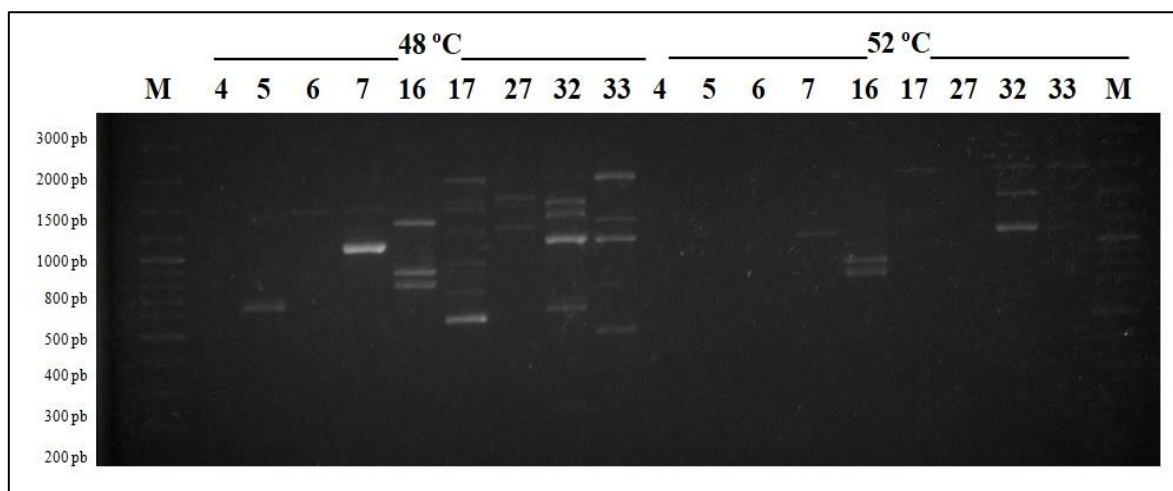
De um total de 15 *primers* utilizados, 10 foram selecionados (Tabela 11) para as análises SCoT de plantas de *C. spinosa* oriundas de ápices criopreservados, por apresentarem considerável número de bandas nítidas e contáveis (4 - 12 bandas).

Figura 33 - Padrões de amplificação por SCoT produzidos em amostras de DNA de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa*.



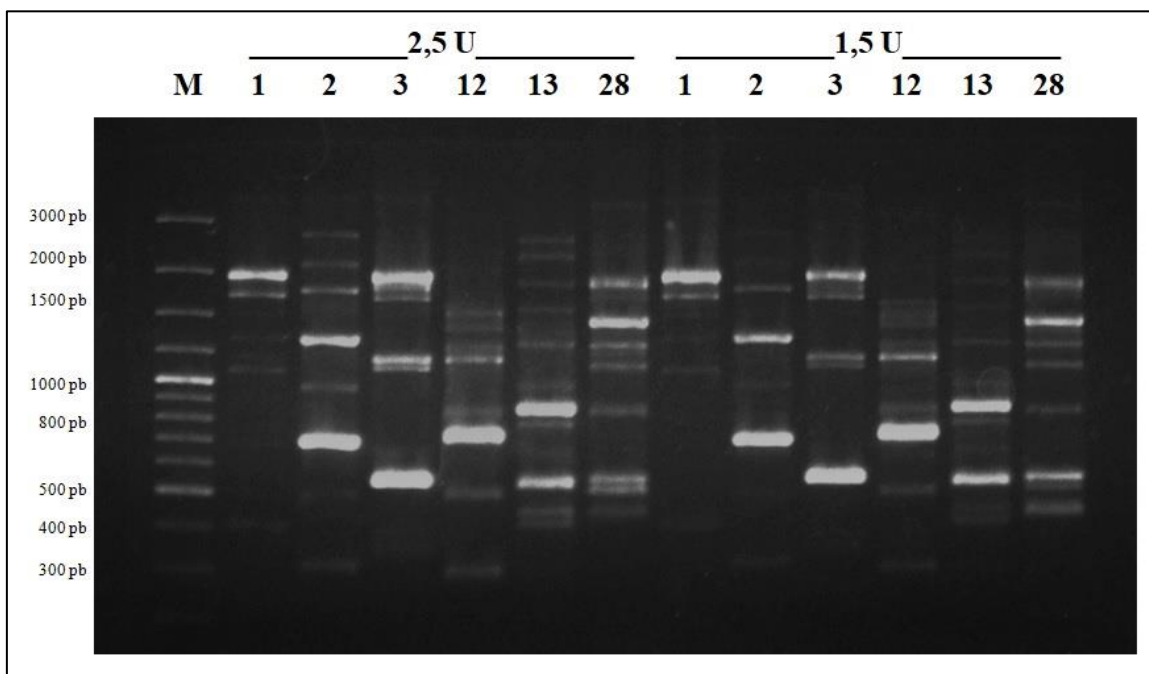
Legenda: Amplificação utilizando Taq DNA polimerase a uma concentração de 1,5 U. Avaliação utilizando uma planta (a); Avaliação da reprodutibilidade utilizando duas plantas distintas. Os números representam os diferentes *primers* avaliados. M = marcador de peso molecular.

Figura 34 - Padrões de amplificação por SCoT produzidos a partir de amostras de DNA de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* utilizando duas temperaturas de anelamento distintas.



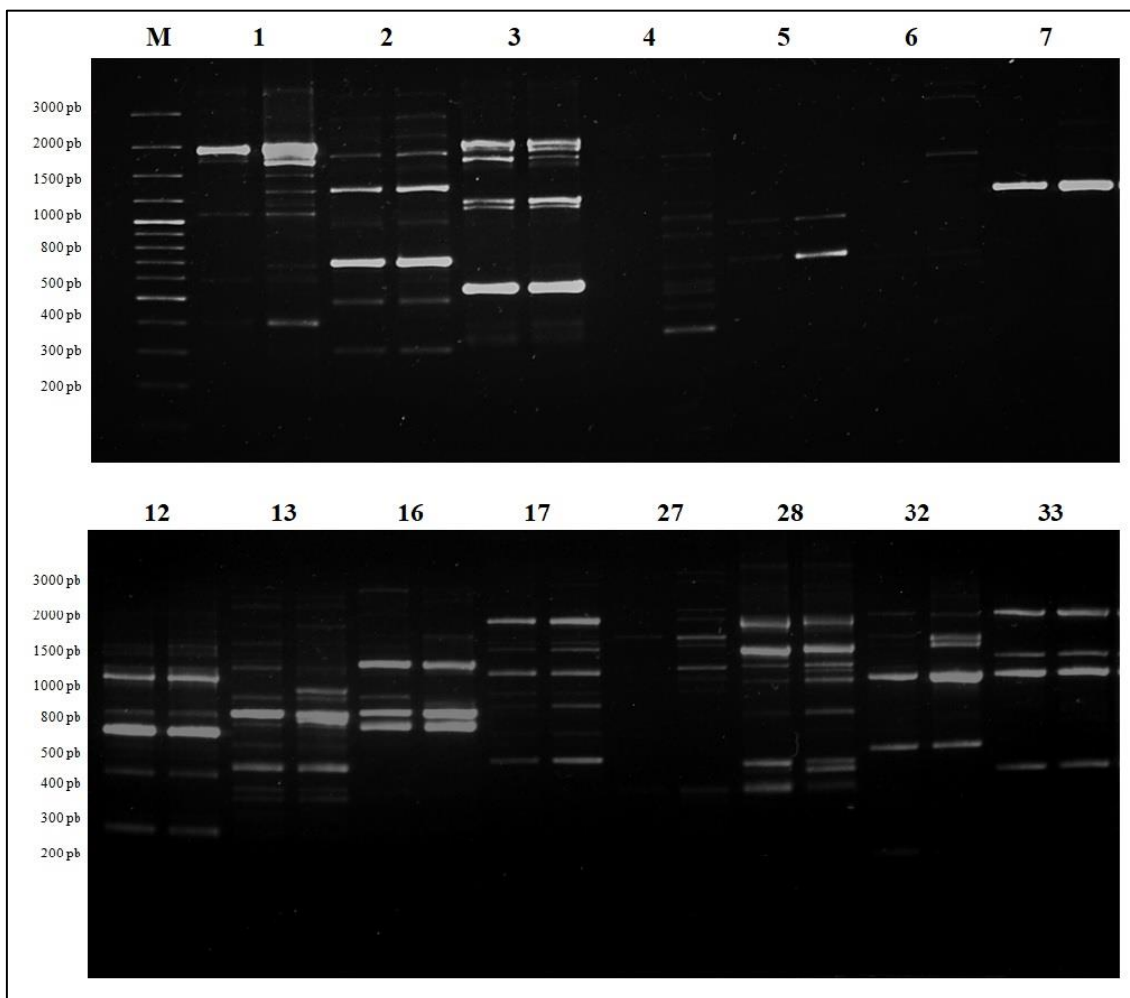
Legenda: Os números representam os diferentes *primers* avaliados. M = marcador de peso molecular.

Figura 35 - Padrões de amplificação por SCoT produzidos a partir de amostras de DNA de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* utilizando Taq DNA polimerase a duas concentrações distintas.



Legenda: Os números representam os diferentes *primers* avaliados. As amplificações foram realizadas utilizando uma temperatura de anelamento a 50 °C. M = marcador de peso molecular.

Figura 36 - Padrões de amplificação por SCoT produzidos a partir amostras de DNA de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* utilizando 2,5 U Taq DNA polimerase a duas temperaturas de anelamento distintas.



Legenda: Os números representam os diferentes *primers* avaliados. A primeira coluna para cada *primer* representa a temperatura de 50 °C e a segunda coluna, a temperatura de 48 °C. M = marcador de peso molecular.

Tabela 11 - Número e tamanho de produtos de amplificação obtidos na triagem dos *primers* utilizados para a técnica SCoT.

Código do primer	Sequência (5' → 3')	TA (°C)	N° de bandas	Tamanho dos fragmentos (pb)
S 1	CAACAATGGCTACCACCA	48	9	400 – 2000
S 2	CAACAATGGCTACCACCC	48	9	300 - >3000
S 3	CAACAATGGCTACCACCG	48	8	400 - >3000
S 4	CAACAATGGCTACCACCT	48	10	400 – 2000
S 5	CAACAATGGCTACCACGA	48	2	800 – 1000
S 6	CAACAATGGCTACCACGC	48	5	60 - >3000
S 7	CAACAATGGCTACCACGG	48	1	1500
S 12	ACGACATGGCGACCAACG	48	8	300 – 1500
S 13	ACGACATGGCGACCATCG	50	12	400 – 3000
S 16	ACCATGGCTACCACCGAC	50	5	800 – 3000
S 17	ACCATGGCTACCACCGAG	48	8	500 – 2000
S 27	ACCATGGCTACCACCGTG	48	9	400 - >3000
S 28	CCATGGCTACCACCGCCA	48	11	400 - >3000
S 32	CCATGGCTACCACCGCAC	48	5	700 – 2000
S 33	CCATGGCTACCACCGCAG	48	4	500 – 2000

Legenda: Os *primers* marcados em negritos foram selecionados para as análises SCoT.

TA = Temperatura de anelamento.

Os produtos gerados pelas reações de amplificação SCoT apresentaram um padrão de bandas homogêneo (Figuras 37 a-c). Os 10 *primers* amplificaram 97 fragmentos, variando de 04 a 16 por amostra, com uma média de 9,7 bandas por *primer*. O intervalo dos fragmentos amplificados variou de 100 a >3000 pares de base. A menor amplitude de fragmentos foi no *primer* S 33 (450 a 2000 pb) e a maior no S 28 (100 a 3000 pb), conforme evidenciado na tabela 12.

A partir dessas amplificações foram originados um total de 2619 fragmentos (Tabela 12). Desse total, 2618 (99,97 %) foram monomórficos e um (0,03 %) polimórfico entre as plântulas analisadas. A presença do fragmento polimórfico foi evidenciada na amostra P5- (Indivíduo 5 do tratamento controle da criopreservação) do *primer* 13 (Figura 37b).

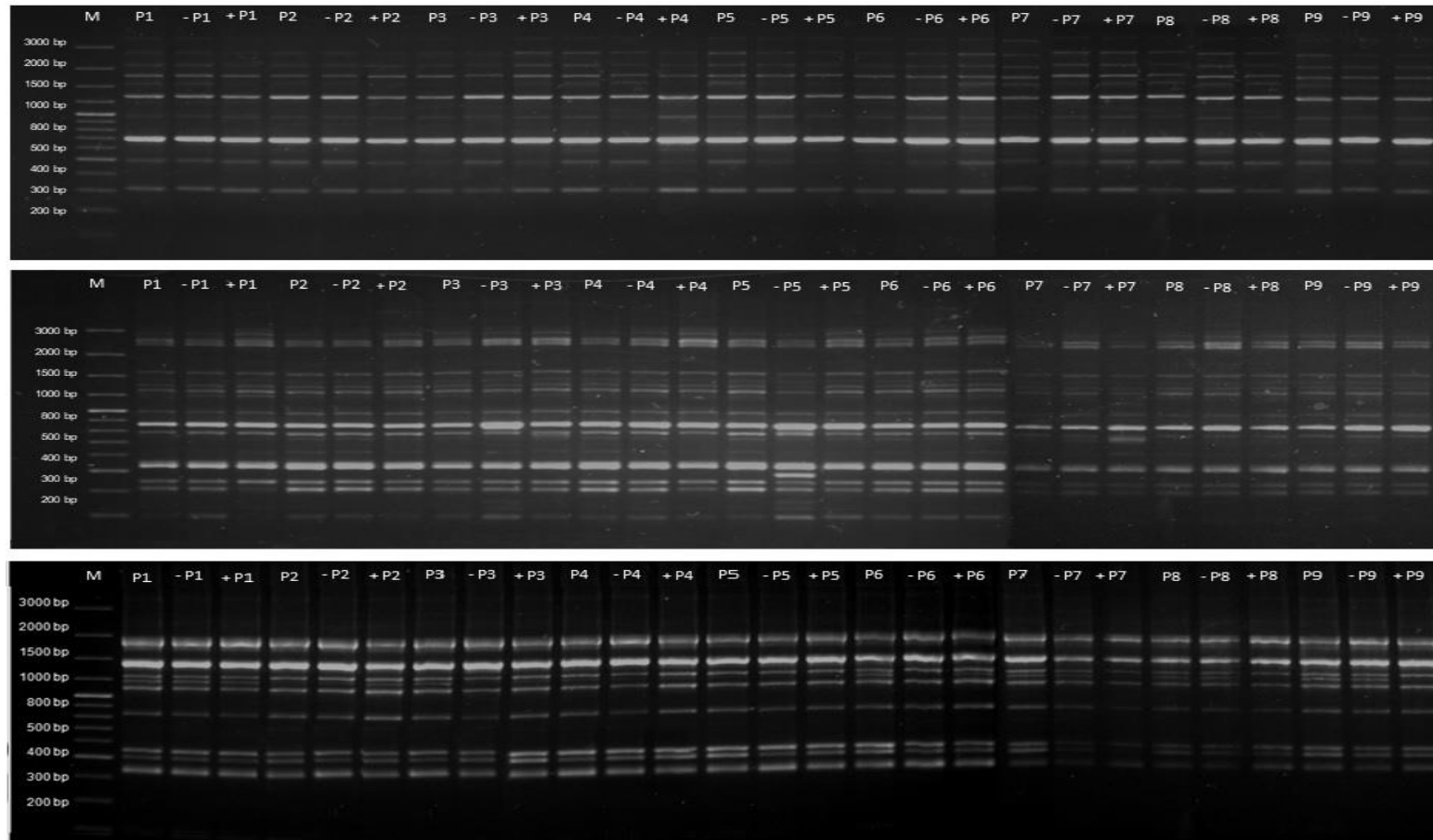
A análise comparativa dos padrões de bandas gerados pela técnica SCoT revelou um alto grau de semelhança entre as amostras criopreservadas e as suas plantas matrizes (Tabela 15). Foi evidenciada divergência na presença de um único fragmento (P5-), resultando 0,99 de similaridade através da avaliação do coeficiente de Jaccard. Ao passo que para as demais amostras, foi observado um índice de similaridade igual a 1,00.

Tabela 12 - Características dos produtos de amplificação detectados com os 10 *primers* utilizados nas análises SCoT realizadas com plantas regeneradas de *C. spinosa*.

Código do primer	Nº de fragmentos amplificados por primer	Nº total de fragmentos amplificados*	Nº de fragmentos polimórficos	Polimorfismo (%)	Tamanho dos fragmentos (pb)
S 1	9	243	0	0	>3000 – 400
S 2	10	270	0	0	>3000 – 300
S 3	9	243	0	0	2000 – 350
S 12	10	270	0	0	>3000 – 100
S 13	16	432	1	0,23	2500 – 100
S 16	11	297	0	0	3000 – 800
S 17	11	297	0	0	>3000 – 500
S 28	11	297	0	0	>3000 – 100
S 32	6	162	0	0	2000 – 800
S 33	4	108	0	0	2000 – 450
Total	97	2619	1	0,03	-

* Nº de fragmentos amplificados x Nº total de amostras

Figura 37 - Padrões de amplificação por SCoT a partir de amostras de DNA de plantas oriundas de tratamentos de V-Crioplaca de *C. spinosa*.



Legenda: Amplificações obtidas com os *primers* 2 (a), 13 (b) e 28 (c) a partir de amostras de DNA de plantas estoques (Px), plantas regeneradas a partir de ápices caulinares que constituíram o experimento controle da criopreservação (-Px) e plantas regeneradas a partir de ápices caulinares submetidos aos experimentos de criopreservação (+Px). M = marcador de peso molecular.

4.4.3 Análise pela técnica ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Tendo em vista os resultados obtidos com a técnica de SCoT, optou-se por utilizar a mesma concentração da enzima Taq DNA polimerase (2,5 U) nos ensaios de ISSR. Inicialmente foram analisados 17 *primers* quanto ao número de fragmentos gerados como produtos de amplificação, utilizando 40 °C como temperatura de anelamento. A partir dessa ciclagem, foi possível observar a formação de uma grande quantidade de bandas. Do total avaliado, treze *primers* apresentaram produtos de amplificação, sendo observada a formação de um total de 102 fragmentos, os quais variaram de 200 a 3000 pb (Figura 38a).

Visando estabelecer as condições mais adequadas para a técnica ISSR foi investigado o efeito do aumento da temperatura de anelamento (42, 45 e 48 °C) no padrão de bandas resultante após as reações de amplificação (Figuras 38b - 38d). Entre as temperaturas de anelamento avaliadas, a de 45 °C resultou em um total de 118 fragmentos amplificados, o maior número encontrado, que variaram de 150 a 3000 pb (Tabela 13). Além disso, a essa temperatura houve a formação de fragmentos mais nítidos em comparação com as reações executadas nas demais temperaturas avaliadas (Figura 38c). Dessa forma, optou-se por empregar a temperatura de anelamento de 45 °C nos ensaios.

De um total de 17 *rimers* avaliados, 10 foram selecionados (Tabela 13) para as análises ISSR de plantas de *C. spinosa* oriundas de ápices criopreservados, por apresentarem considerável número de bandas nítidas e contáveis (4- 16 bandas).

Figura 38 - Padrões de amplificação por ISSR produzidos a partir de amostras de DNA de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* utilizando 2,5 U Taq DNA polimerase a diferentes temperaturas de anelamento (Continua).

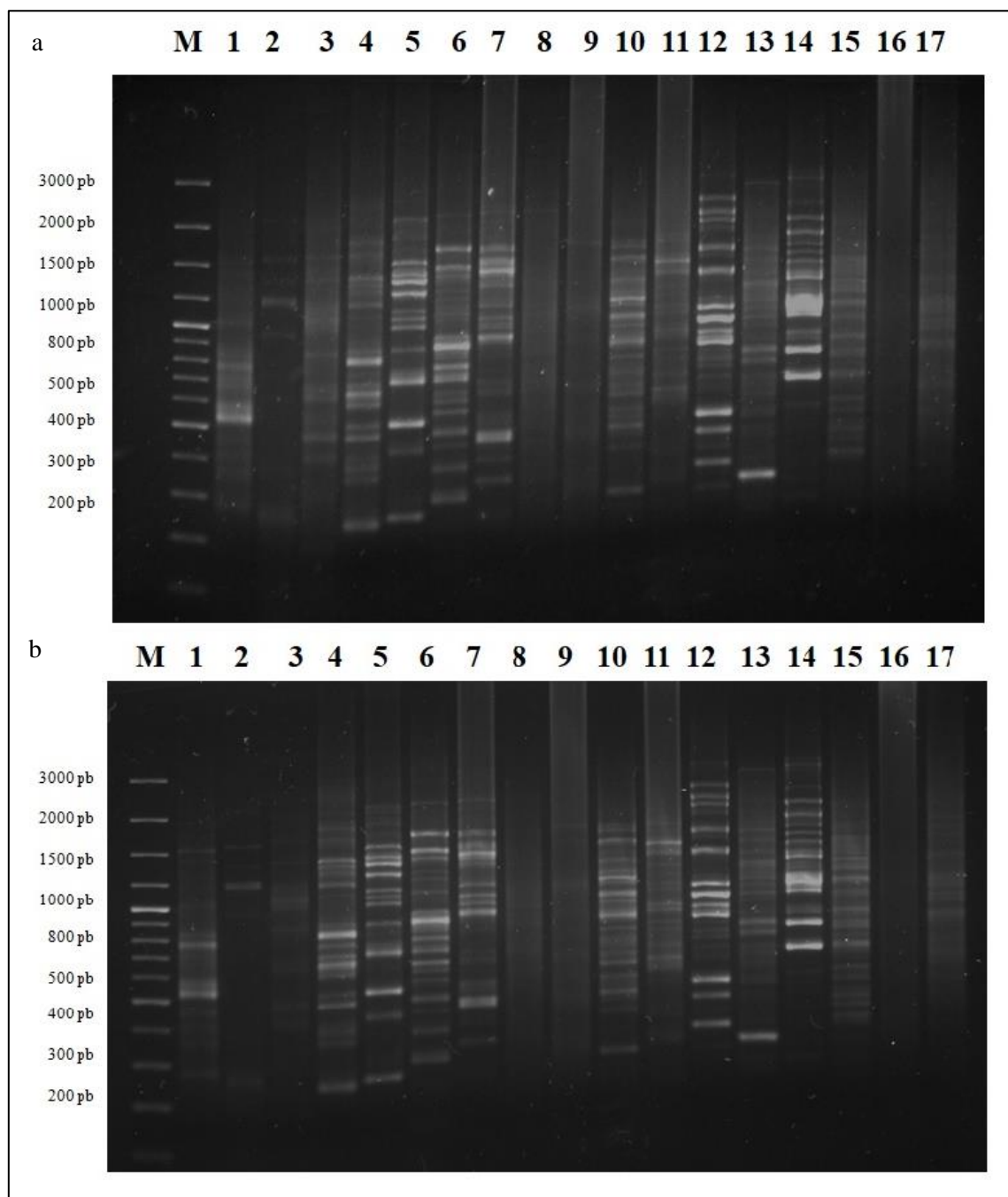
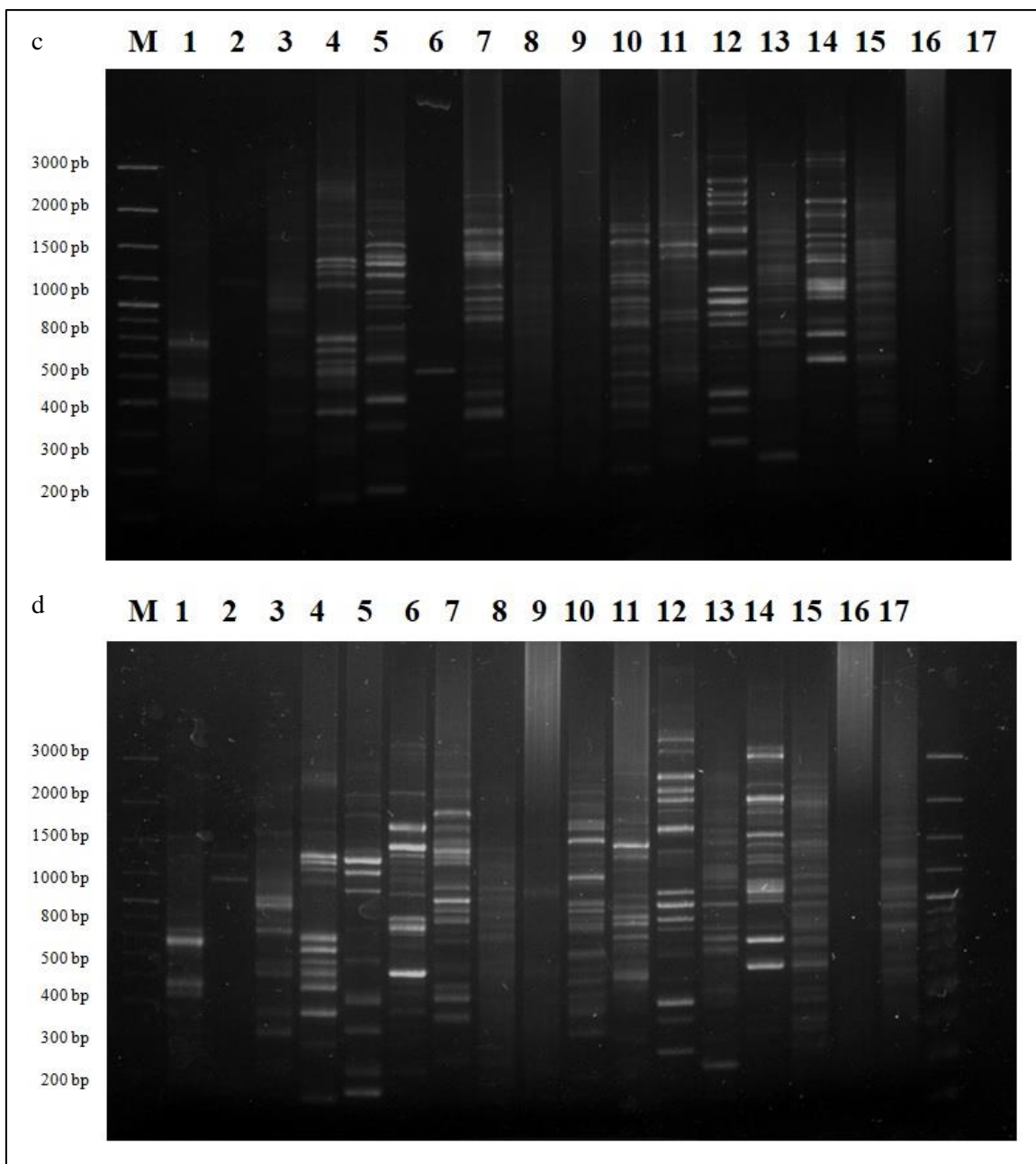


Figura 38 - Padrões de amplificação por ISSR produzidos a partir de amostras de DNA de plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* utilizando 2,5 U Taq DNA polimerase a diferentes temperaturas de anelamento (Conclusão).



Legenda: Padrão de amplificação utilizando 40 °C (a); 42 °C (b); 45 °C (c) e 48 °C (d). Os números representam os diferentes *primers* avaliados. M = marcador de peso molecular.

Tabela 13 - Número e tamanho de produtos de amplificação obtidos na triagem inicial dos *primers* para a técnica ISSR.

Código do primer	Sequência (5' → 3')	TA (°C)	Nº de bandas	Tamanho dos fragmentos (pb)
I 1	CTCTCTCTCTCTCTTTG	45	4	400 – 700
I 2	CTCTCTCTCTCTCTTAG	45	3	300 – 900
I 3	CTCTCTCTCTCTCTTGC	45	8	300 – 1500
I 4	CACACACACACAAC	45	13	<200 – 2000
I 5	CACACACACACAGT	45	15	<200 – 2000
I 6	GAGAGAGAGAGAGG	40	13	300 – 2000
I 7	GTGTGTGTGTGTGG	45	12	300 – 2000
I 8	GAGAGAGAGAGACC	48	9	200 – 1500
I 9	GTGTGTGTGTGTCC	–	0	–
I 10	CACCACCACGC	45	15	150 – 2000
I 11	GAGGAGGAGGC	45	8	500 – 1500
I 12	CTCCTCCTCGC	45	15	300 – 2000
I 13	GTGGTGGTGGC	40	11	200 – 1500
I 14	GTGTGTGTGTGTGTGTC	40	13	500 – 3000
I 15	ACACACACACACACAG	45	16	350 – 2000
I 16	CACACACACACAAG	–	0	–
I 17	CACACACACACAGG	48	6	400 – 1500

Legenda: Os *primers* marcados em negrito foram selecionados para as análises ISSR.

TA = Temperatura de anelamento.

Os produtos gerados pelas reações de amplificação ISSR apresentaram um padrão de bandas homogêneo (Figuras 39a - 39c). Os 10 *primers* amplificaram 161 fragmentos, variando de 08 a 20 por amostra, com uma média de 16,1 bandas por *primer*. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 100 a 3000 pb (Tabela 14)

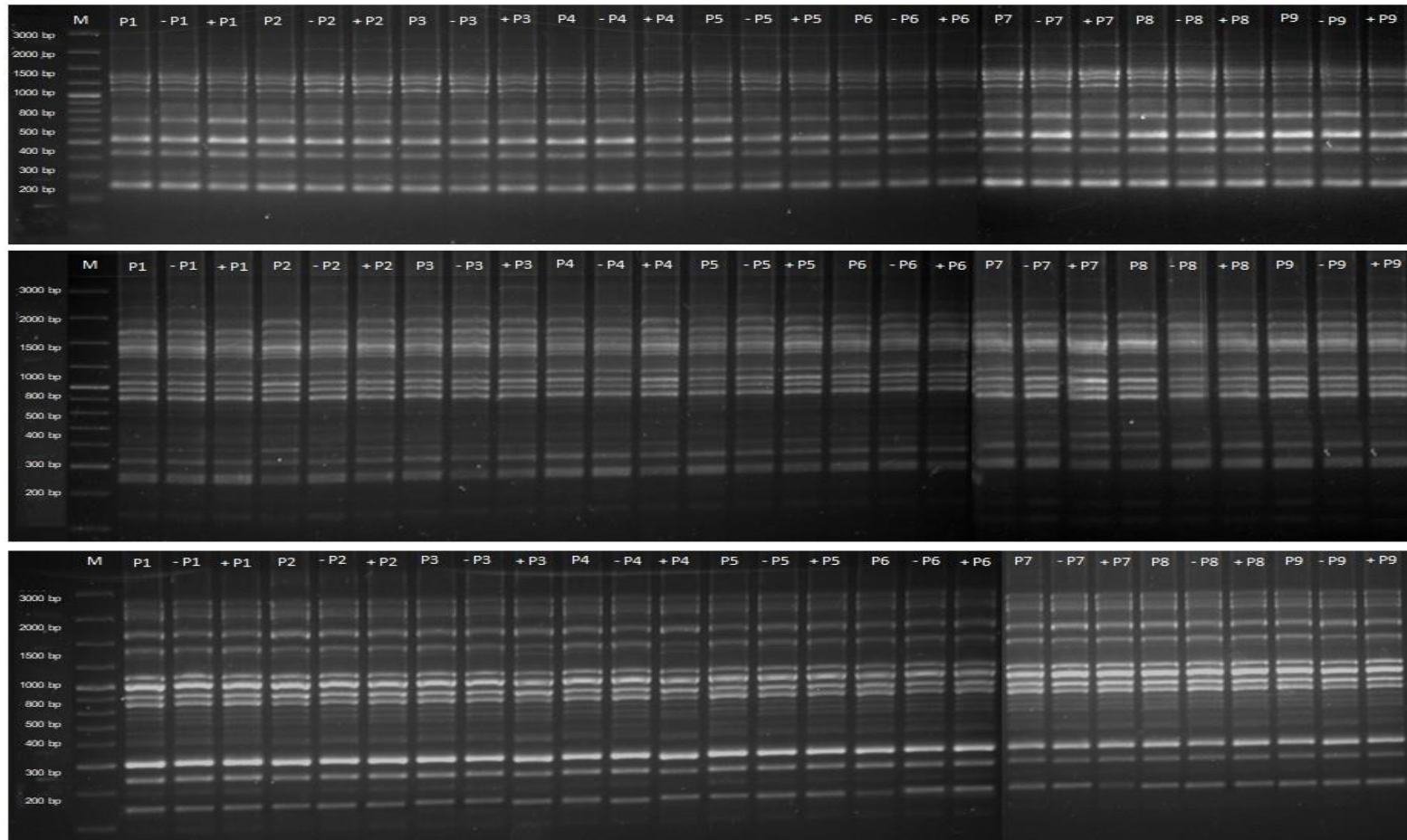
A partir dessas ampliações foram originados um total de 4347 fragmentos sendo todos monomórficos (100%), conforme expresso na tabela 15. A similaridade das amostras foi corroborada através do cálculo utilizando o índice de Jaccard que revelou um alto grau de semelhança (1,00) entre todas as amostras investigadas por meio da técnica ISSR (Tabela 15).

Tabela 14 - Características dos produtos de amplificação detectados com os 10 *primers* utilizados nas análises ISSR.

Código do <i>primer</i>	Nº de fragmentos amplificados	Nº total de fragmentos amplificados*	Nº de fragmentos polimórficos	Polimorfismos (%)	Tamanho dos fragmentos (pb)
I 1	8	216	0	0	1800 – 200
I 4	11	297	0	0	1300 – 250
I 5	12	324	0	0	2000 – 350
I 6	12	324	0	0	2000 – 300
I 7	19	513	0	0	3000 – 250
I 10	16	432	0	0	1500 – 300
I 11	20	540	0	0	1800 – 100
I 12	20	540	0	0	2800 – 200
I 13	17	459	0	0	2500 – 200
I 14	15	405	0	0	3000 – 300
I 15	11	297	0	0	2000 – 300
Total	161	4347	0	0	-

* N° de fragmentos amplificados x N° total de amostras

Figura 39 - Padrões de amplificação por ISSR a partir de amostras de DNA de plantas oriundas de tratamentos de V-Crioplaca de *C. spinosa*.



Legenda: Amplificações obtidas a partir dos *primers* 5 (a), 7 (b) e 12 (c) em amostras de DNA de plantas estoques (Px), plantas regeneradas a partir de ápices caulinares que constituíram o experimento controle da criopreservação (-Px) e plantas regeneradas a partir de ápices caulinares submetidos aos experimentos de criopreservação (+Px). M = marcador de peso molecular.

Tabela 15 - Similaridade genética, de acordo com o Coeficiente de Jaccard, obtida por análise SCoT e ISSR

Indivíduo	SCoT		ISSR	
	Número de Fragmentos amplificados por amostra	Similaridade genética	Número de Fragmentos amplificados por amostra	Similaridade genética
PM	97	--	161	--
P1-	97	1,00	161	1,00
P1+	97	1,00	161	1,00
P2-	97	1,00	161	1,00
P2+	97	1,00	161	1,00
P3-	97	1,00	161	1,00
P3+	97	1,00	161	1,00
P4-	97	1,00	161	1,00
P4+	97	1,00	161	1,00
P5-	98	0,99	161	1,00
P5+	97	1,00	161	1,00
P6-	97	1,00	161	1,00
P6+	97	1,00	161	1,00
P7-	97	1,00	161	1,00
P7+	97	1,00	161	1,00
P8-	97	1,00	161	1,00
P8+	97	1,00	161	1,00
P9-	97	1,00	161	1,00
P9+	97	1,00	161	1,00

PM = Planta matriz (P1 - P9).

4.5 Determinação do perfil fitoquímico

4.5.1 Rendimento dos extratos

Após a liofilização dos materiais, foram utilizadas 10 g de material seco para o preparo dos extratos. Os dados relativos aos pesos do material fresco e seco, assim como ao rendimento após o processo de extração, estão descritos na Tabela 16. O maior rendimento foi obtido para o material coletado a campo (PV), enquanto que as plantas propagadas *in vitro*, tanto aquelas mantidas em estoque (PE) como as regeneradas a partir dos ápices criopreservados (PC), resultaram em valores de rendimento similares. Os extratos concentrados apresentavam coloração diferentes entre si, onde a amostra PV apresentava coloração esverdeada, enquanto PE e PC apresentavam coloração marrom.

Tabela 16 - Rendimento dos extratos metanólicos de *C. spinosa* obtidos a partir de material coletado a campo e propagado *in vitro*.

Origem	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Resíduo (g)	Rendimento (%)
PV	51,39	10	2,060	4,00
PE	54,02	10	1,614	2,98
PC	54,02	10	1,601	2,96

Legenda: PV - parte aérea *in vivo*; PE - plantas *in vitro* mantidas em estoque; PC - plantas regeneradas de criopreservação

4.5.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD-UV)

Na análise do perfil fitoquímico de *C. spinosa* foram investigados cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em diferentes comprimentos de onda: 190, 210, 254, 300, 340, 420, 480 e 600 nm. Para realizar uma comparação entre as amostras e determinar um perfil cromatográfico (*fingerprint*), o comprimento de onda de 254 nm foi escolhido para realizar uma análise inicial por permitir a visualização de um maior número de substâncias sem sofrer influência dos solventes orgânicos da fase móvel (ácido acético e acetonitrila).

Em todas as amostras de *C. spinosa* foi observado um grande número de sinais nos cromatogramas, demonstrando a diversidade de substâncias em sua composição (Figura 40).

A amostra PV apresentou uma maior diversidade de substâncias, enquanto aquelas preparadas a partir de plantas propagadas *in vitro* (PE e PC) mostraram *fingerprints* similares. Foram obtidos 33, 30 e 42 sinais para os extratos de PV, PE e PC, respectivamente, considerando os mesmos parâmetros de integração.

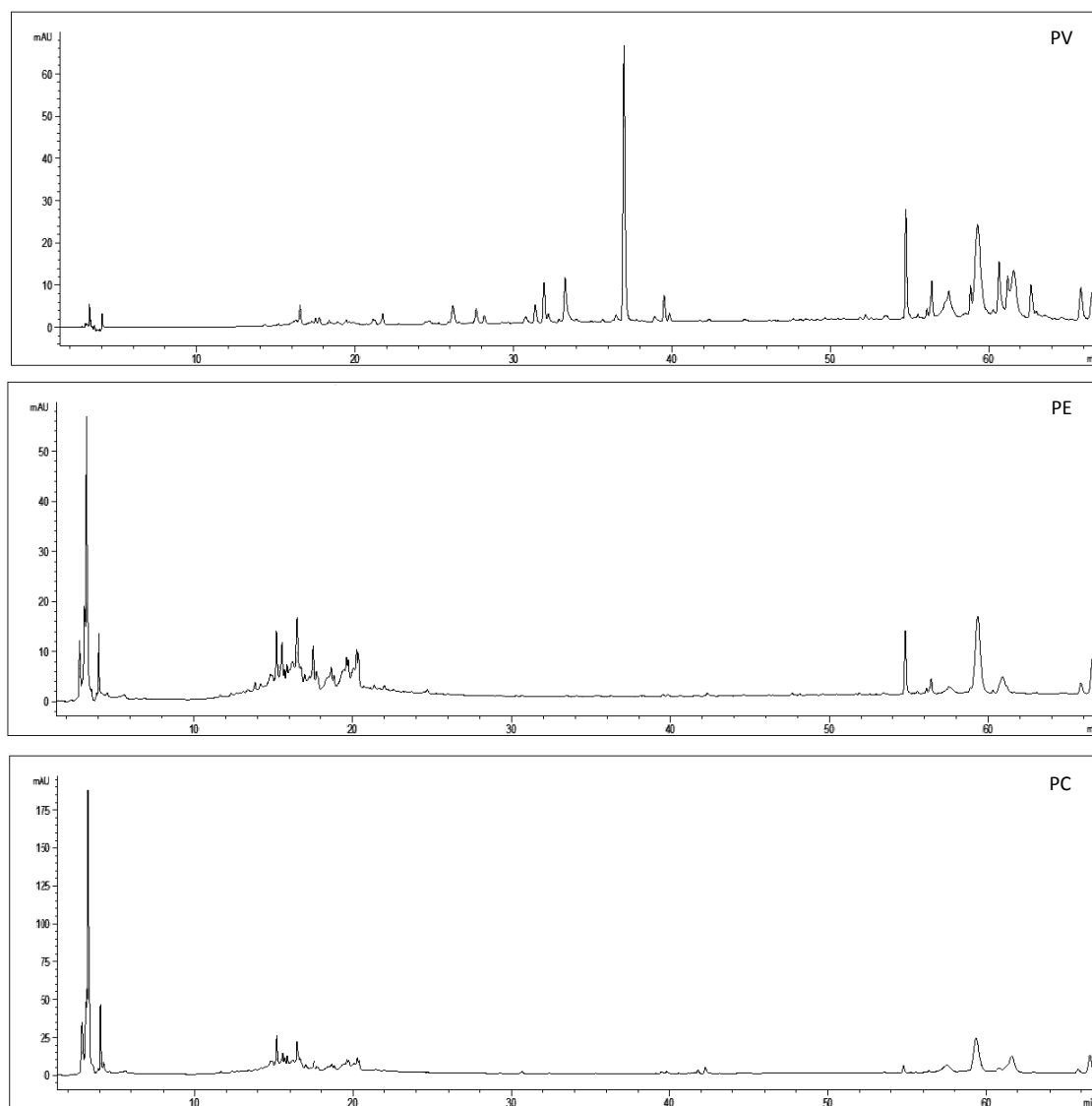
Oito sinais com tempos de retenção semelhantes foram encontrados nas três amostras. As amostras dos materiais *in vitro* (PE e PC) compartilharam 13 sinais. Já as amostras PV e PC, apresentaram quatro sinais em comum e PV e PE, apenas um sinal em comum (Tabela 17). Sendo assim, a partir da análise do Coeficiente de Jaccard, foi possível constatar que as amostras PE e PC apresentaram maior grau de similaridade (0,8). Enquanto PV foi a que mais diferiu das demais, apresentando um índice de similaridade igual a 0,4 (Figura 41).

Foi possível evidenciar uma grande concentração de sinais nos intervalos de tempo de 14 - 20 e 54 - 60 minutos, sobretudo para os materiais propagados *in vitro*, o que sugere a presença de substâncias com alta polaridade (nos menores tempos de retenção) e baixa polaridade (nos maiores tempos de retenção). Já para o material *in vivo* (PV), os sinais se encontraram distribuídos ao longo de toda a corrida, caracterizando a presença de substâncias de alta, média e baixa polaridade.

Tendo em vista apenas os sinais compartilhados entre as três amostras e considerando a porcentagem de área relativa desses sinais, foi possível estabelecer uma relação entre o tempo de retenção, a concentração dessas substâncias e seu padrão de distribuição nas amostras analisadas (Tabela 17). Sinais encontrados até 20 minutos

apresentaram maior concentração nos materiais cultivados *in vitro* (PE e PC). Conforme o tempo de retenção foi aumentado, houve uma inversão desse padrão: as maiores concentrações foram obtidas em planta *in vivo* (PV).

Figura 40 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 254 nm a partir de extratos metanólicos brutos de *C. spinosa*.



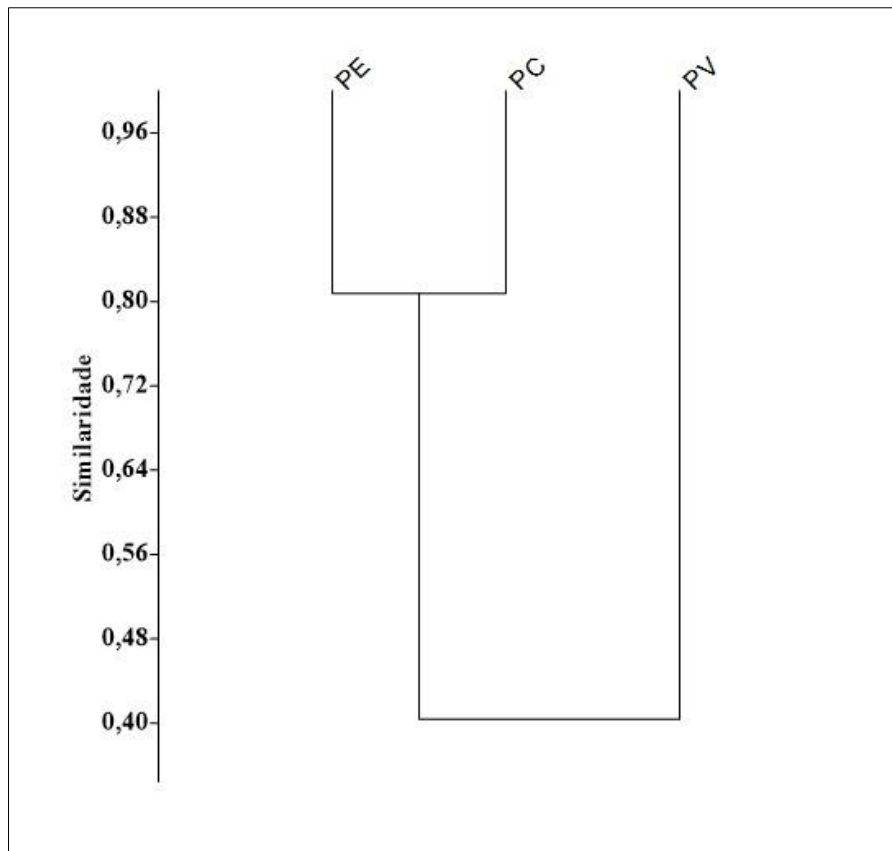
Legenda: Parte aérea *in vivo* (PV); plantas estoques mantidas em *in vitro* (PE); plantas oriundas do processo de criopreservação (PC).

Tabela 17 - Tempos de retenção e áreas relativas dos sinais observados nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 254 nm a partir de extratos metanólicos de *C. spinosa*.

Campo (PV)		Estoque (PE)		Criopreservada (PC)	
TR (min)	AR (%)	TR (min)	AR (%)	TR (min)	AR (%)
3,23	0,03	2,81	0,13	2,87	0,22
3,55	0,03	3,10	0,27	3,10	0,22
4,03	0,04	3,24	0,56	3,18	0,22
16,53	0,04	4,02	0,08	3,24	1,10
17,51	0,01	13,85	0,01	3,89	0,01
17,73	0,02	15,20	0,09	4,02	0,20
21,75	0,03	15,55	0,09	4,21	0,05
26,17	0,08	15,70	0,01	5,64	0,01
27,65	0,06	15,86	0,02	14,80	0,03
28,16	0,03	16,21	0,06	14,93	0,02
30,78	0,03	16,51	0,14	15,18	0,12
31,37	0,07	16,75	0,01	15,55	0,05
32,20	0,04	16,98	0,01	15,68	0,01
33,26	0,23	17,51	0,11	15,84	0,03
36,47	0,04	17,72	0,05	16,18	0,04
36,97	1,05	18,66	0,06	16,45	0,15
38,91	0,03	18,82	0,02	16,61	0,05
39,51	0,09	19,62	0,12	16,98	0,01
39,84	0,03	19,72	0,03	17,51	0,03
52,22	0,01	20,26	0,05	17,72	0,02
54,77	0,37	20,37	0,04	18,51	0,04
56,10	0,02	54,77	0,16	18,82	0,02
56,41	0,12	56,10	0,01	19,44	0,04
57,48	0,29	56,41	0,04	19,62	0,03
58,85	0,08	58,86	0,01	19,72	0,02
59,29	0,94	59,33	0,60	20,08	0,03
60,65	0,26	60,89	0,14	20,27	0,06
61,19	0,18	65,83	0,04	20,37	0,03
61,58	0,47	66,55	0,17	30,69	0,01
62,67	0,15	-	-	39,51	0,01
63,01	0,02	-	-	39,83	0,01
65,82	0,17	-	-	41,77	0,01
66,53	0,17	-	-	42,24	0,05
-	-	-	-	54,77	0,04
-	-	-	-	56,41	0,01
-	-	-	-	57,51	0,19
-	-	-	-	59,35	0,66
-	-	-	-	60,86	0,05
-	-	-	-	61,63	0,37
-	-	-	-	65,82	0,03
-	-	-	-	66,56	0,19

Legenda: TR = tempo de retenção; AR = área relativa.

Figura 41 - Dendograma gerado pelo método de Cluster usando o Coeficiente de Jaccard para os diferentes extratos metanólicos de *C. spinosa*.



Legenda: Plantas estoques mantidas em *in vitro* (PE); plantas oriundas do processo de criopreservação (PC); e parte aérea *in vivo* (PV).

Após uma análise geral em 254 nm, foram avaliados também os cromatogramas obtidos em 480 e 340 nm, comprimentos de onda associados com a detecção de metabólitos da classe dos carotenoides e flavonoides, respectivamente.

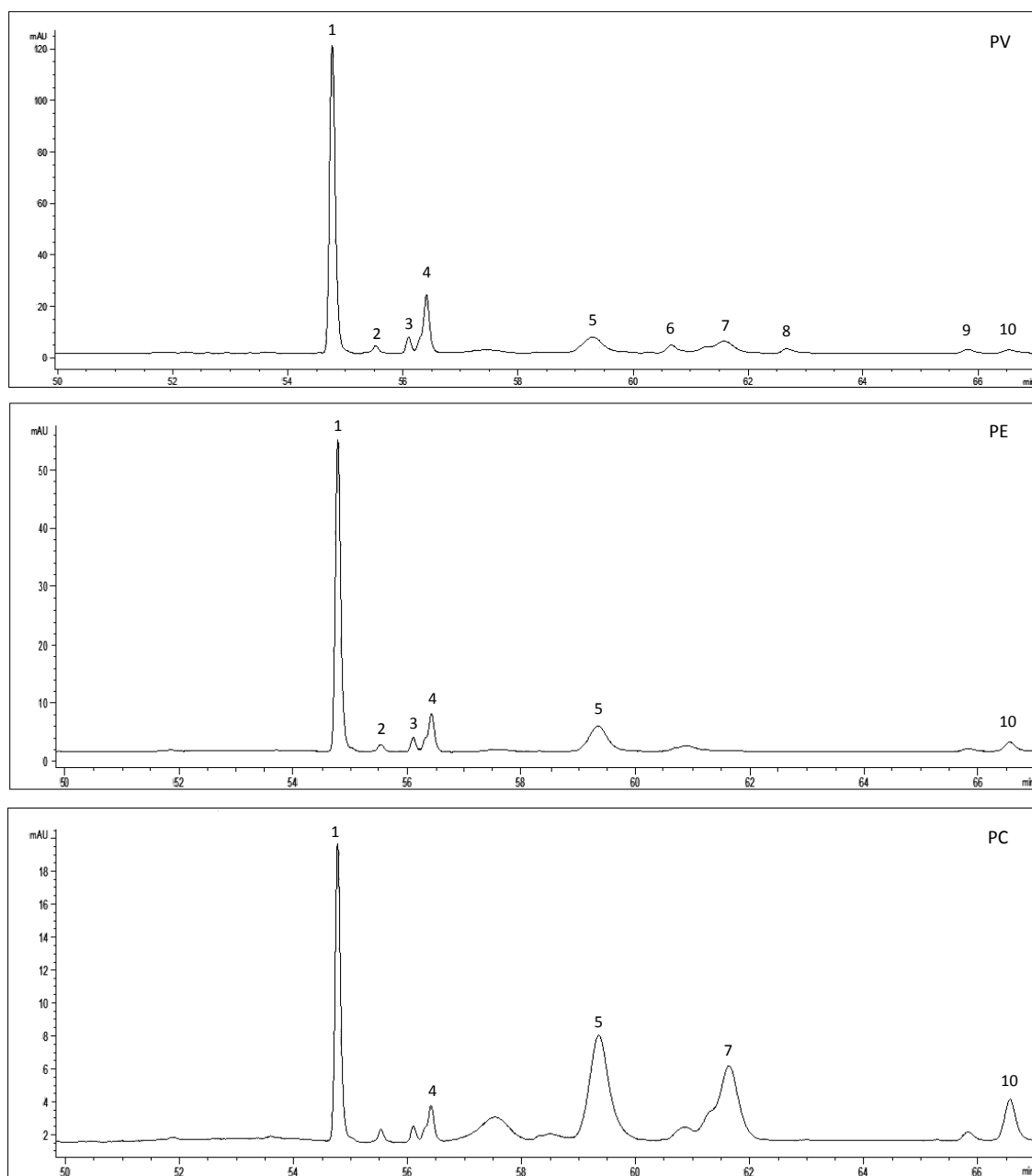
A análise dos cromatogramas obtidos em 480 nm (Figura 42) revelou a presença de sinais que se concentraram, principalmente, na faixa de 54 - 66 minutos (Tabela 18), período em que a fase móvel é constituída de acetonitrila pura ou com pouca quantidade de água, sugerindo a presença de substâncias de baixa polaridade (Figura 42).

A análise dos espectros de absorção em UV revelou a presença de sinais indicativos de substâncias pertencentes a classe dos carotenoides. A tabela 19 mostra alguns desses espectros de absorção visualizados em diferentes comprimentos de onda.

A análise dos cromatogramas obtidos em 340 nm (Figuras 43 e 44) revelou a presença de sinais que se concentraram, principalmente, na faixa de 14 - 22 minutos e 30 - 38 minutos (Tabela 20), sugerindo a presença de substâncias de alta e média polaridade, respectivamente (Figuras 43 e 44). Os sinais observados na amostra PV encontram-se distribuídos ao longo de ambas as faixas de tempos de retenção (Figura 43 e 44), ao passo que aqueles encontrados nas amostras PE e PC, encontram-se distribuídos majoritariamente na faixa de 14 - 22 minutos, caracterizando a presença de substâncias de alta polaridade, (Figura 43).

A análise dos espectros de absorção em UV sugere a presença de sinais indicativos de flavonoides glicosilados, de maior polaridade, e suas agliconas, de menor polaridade (Tabela 21).

Figura 42 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 480m nm (50 - 60 min) a partir de extratos metanólicos brutos de *C. spinosa*.



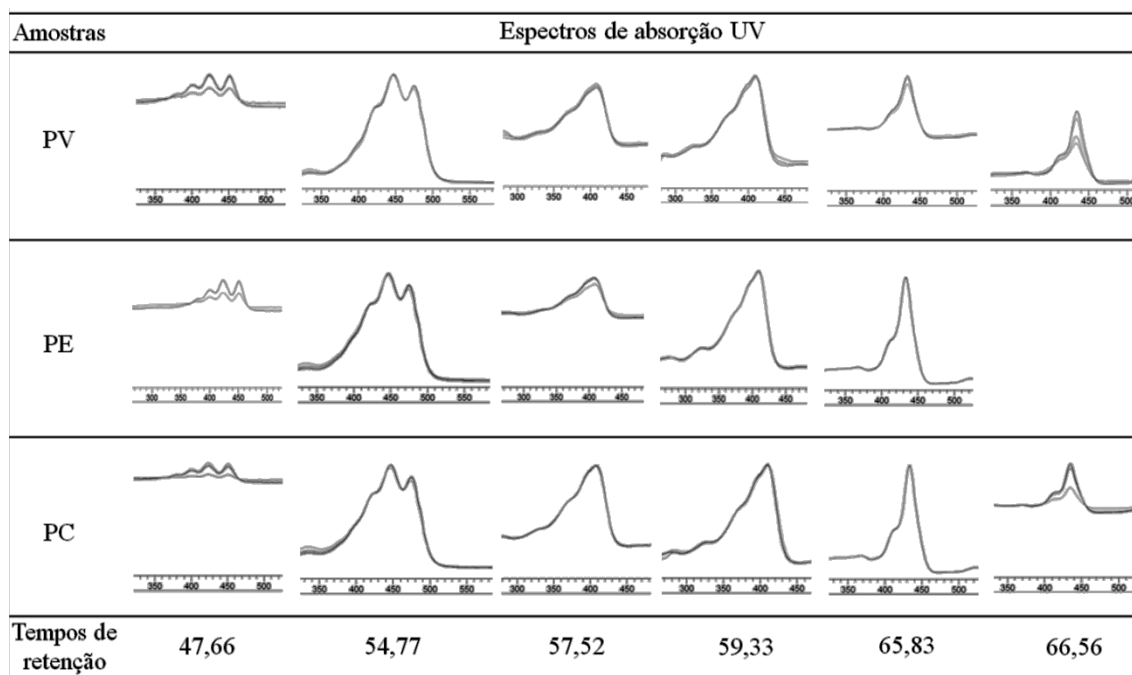
Legenda: Parte aérea *in vivo* (PV); plantas estoques mantidas em *in vitro* (PE); plantas oriundas do processo de criopreservação (PC). Os números indicam os sinais compartilhados pelas três amostras.

Tabela 18 - Tempos de retenção e áreas relativas dos sinais observados nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 480 nm a partir de extratos metanólicos de *C. spinosa*.

Sinais	Campo (PV)		Estoque (PE)		Criopreservada (PC)	
	TR (min)	AR (%)	TR (min)	AR (%)	TR (min)	AR (%)
1	54,77	1,51	54,77	0,64	54,77	0,15
2	55,52	0,04	55,53	0,01	-	-
3	56,09	0,06	56,10	0,02	-	-
4	56,41	0,33	56,41	0,10	56,41	0,02
5	59,29	0,25	59,33	0,16	59,35	0,18
6	60,66	0,06	-	-	-	-
7	61,58	0,20	-	-	61,63	0,13
8	62,67	0,04	-	-	-	-
9	65,82	0,03	-	-	-	-
10	66,53	0,04	66,55	0,03	66,56	0,04

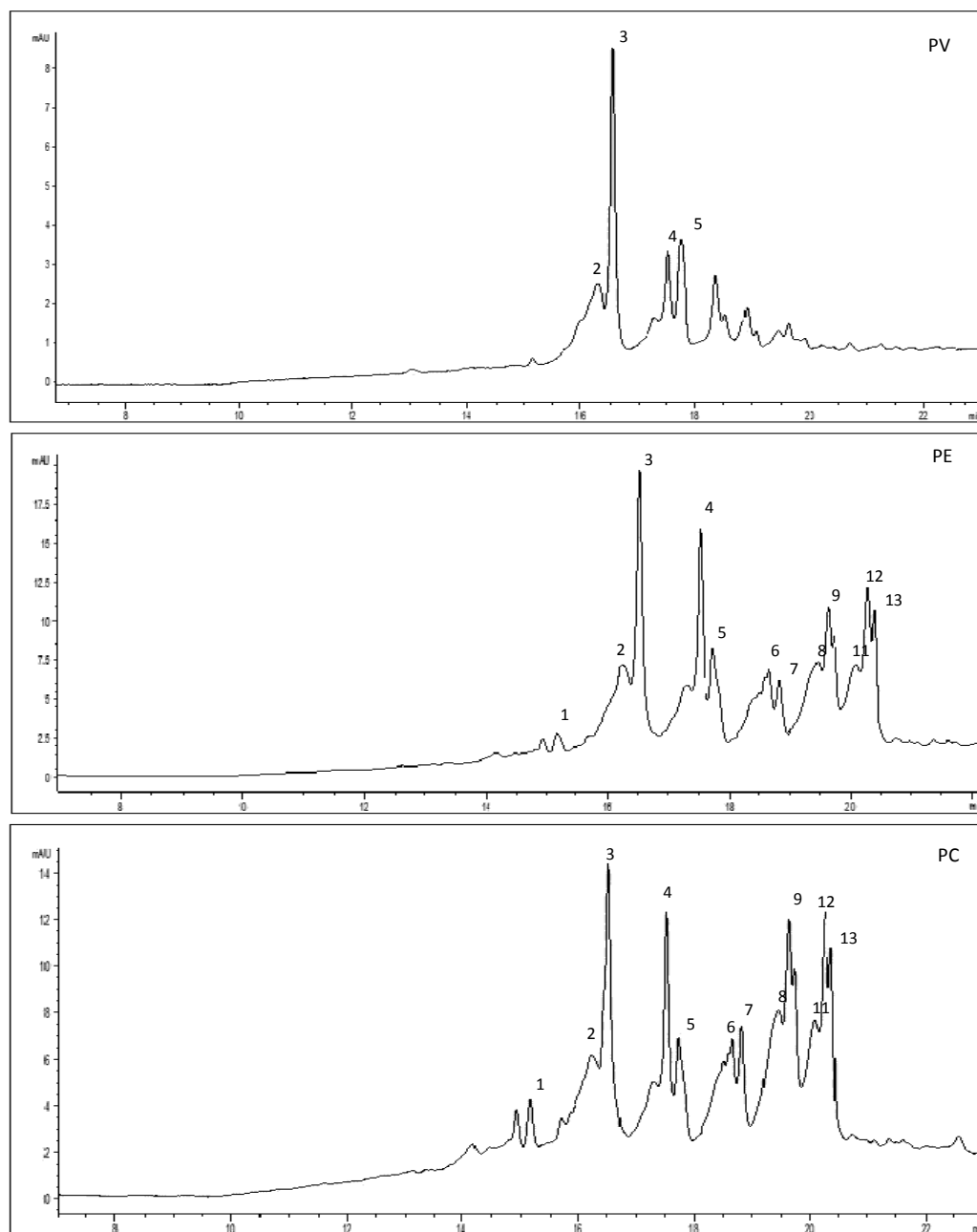
Legenda: TR = tempo de retenção; AR = área relativa.

Tabela 19 - Espectros de absorção UV indicativos de carotenoides, referentes aos sinais obtidos a partir das análises cromatográficas de extratos metanólicos de *C. spinosa*.



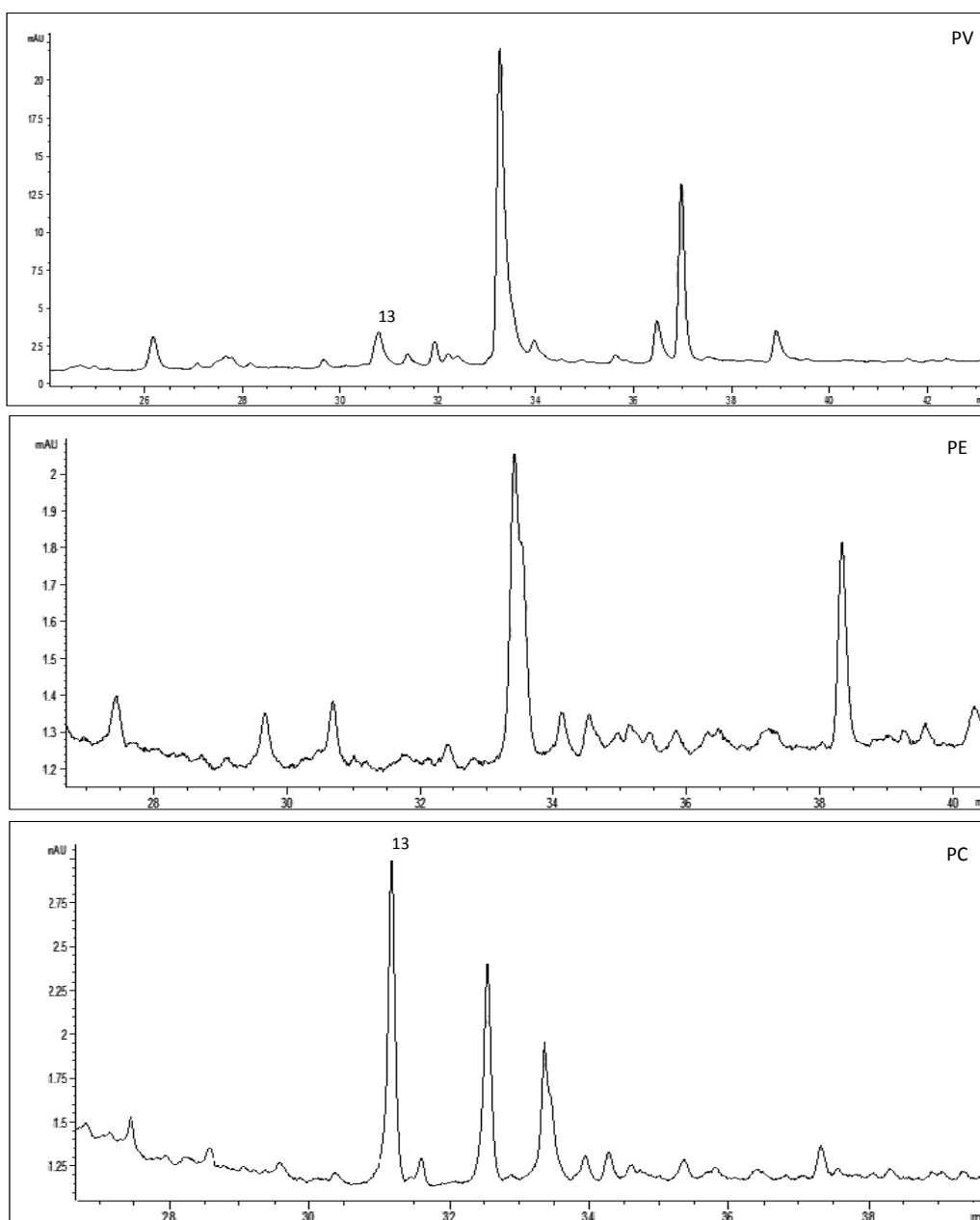
Legenda: Parte aérea *in vivo* (PV); plantas estoques mantidas em *in vitro* (PE); plantas oriundas do processo de criopreservação (PC).

Figura 43 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 340 nm (5 - 25 minutos) a partir de extratos metanólicos de *C. spinosa*.



Legenda: Parte aérea *in vivo* (PV); plantas estoques mantidas em *in vitro* (PE); plantas oriundas do processo de criopreservação (PC). Os números indicam os sinais compartilhados pelas três amostras.

Figura 44 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 340 nm (25-30 minutos) a partir de extratos metanólicos de *C. spinosa*.



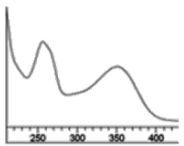
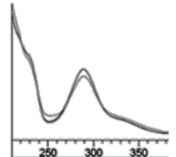
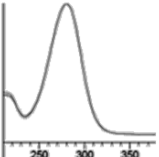
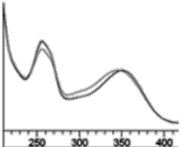
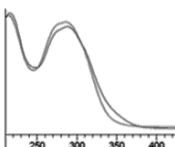
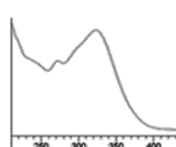
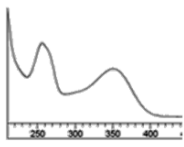
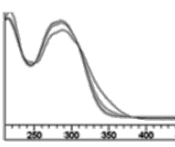
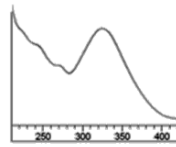
Legenda: Parte aérea *in vivo* (PV); plantas estoques mantidas em *in vitro* (PE); plantas oriundas do processo de criopreservação (PC). Os números indicam os sinais compartilhados pelas três amostras.

Tabela 20 - Tempos de retenção e áreas relativas dos sinais observados nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV em 340 nm a partir de extratos metanólicos de *C. spinosa*.

Sinais	Campo (PV)		Estoque (PE)		Criopreservada (PC)	
	TR (min)	AR (%)	TR (min)	AR (%)	TR (min)	AR (%)
1	-	-	15,15	0,01	15,17	0,01
2	16,27	0,04	16,25	0,19	16,24	0,08
3	16,53	0,08	16,52	0,21	16,52	0,12
4	17,51	0,02	17,51	0,17	17,51	0,13
5	17,73	0,03	17,72	-	17,72	0,05
6	-	-	18,65	0,01	18,66	0,04
7	-	-	18,82	0,04	18,82	0,03
8	-	-	19,46	0,11	19,45	0,08
9	-	-	19,62	0,08	19,63	0,06
10	-	-	19,72	0,04	19,72	0,03
11	-	-	20,07	0,01	20,08	0,01
11	-	-	20,26	0,06	20,27	0,04
13	-	-	20,37	0,05	20,37	30,09

Legenda: TR = tempo de retenção; AR = área relativa,

Tabela 21 - Espectros de absorção no UV indicativos de flavonoides, referentes aos sinais obtidos a partir das análises cromatográficas de extratos metanólicos de *C. spinosa*.

Amostras	Espectros de absorção UV				
PV					
PE					
PC					
Tempos de retenção	17,72	16,18	19,62	27,64	39,51

Legenda: Parte aérea *in vivo* (PV); plantas estoques mantidas em *in vitro* (PE); plantas oriundas do processo de criopreservação (PC).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram propostas duas metodologias de criopreservação, visando dar continuidade à esta linha de pesquisa com a espécie *Cleome spinosa*. Estudos nesta área com representantes da família Cleomaceae ainda são muito limitados. Até o momento, apenas *C. spinosa* e *C. rosea* foram investigadas sob o ponto de vista de conservação *in vitro* em longo prazo, com resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa (CORDEIRO et al., 2015; CORDEIRO; SIMÕES-GURGEL; ALBARELLO, 2016; VILARDO et al., 2019).

Para as duas técnicas propostas, Vitrificação e Dessecação associadas ao uso de Crioplacas de alumínio (V-Crioplaca e D-Crioplaca), foram utilizados ápices caulinares excisados de microestacas cultivadas por duas a três semanas. Alguns estudos já demonstraram a importância do estabelecimento de culturas de microestacas durante um período de tempo pré-determinado para servirem como fontes de explantes para a criopreservação (CHAROENSUB, et al. 2003; MARKOVIĆ et al., 2012). A partir dessas culturas pode-se obter um material fisiologicamente mais homogêneo, minimizando o efeito do tempo em cultura na recuperação do material após a criopreservação (CHAROENSUB, et al. 2003; MARKOVIĆ et al., 2012). Atualmente, diversos trabalhos empregando as técnicas de V- e D-Crioplaca fazem uso das culturas de microestacas para a obtenção de explantes mais uniformes (MATSUMOTO et al., 2014; RAFIQUE et al., 2015; SEKIZAWA et al., 2011; ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015; YAMAMOTO et al., 2012a, 2012b; YAMAMOTO et al., 2015).

Os estudos realizados utilizando a técnica de V-Crioplaca com *C. spinosa*, visaram otimizar a criopreservação de ápices caulinares oriundos de plantas propagadas *in vitro*. Os melhores resultados de sobrevivência (86%) e regeneração (70%) anteriormente obtidos foram conseguidos com pré-tratamento em meio MS enriquecido com concentrações crescentes de sacarose (0,25 M - 0,5 M), exposição ao *loading* (20 min) e tratamento com PVS2 a 0°C por 90 min. Após o reaquecimento, os ápices foram inoculados em meio de recuperação (MS + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP) por 30 dias (VILARDO, 2015). Tendo em vista esses resultados, no presente estudo foi avaliado o efeito de modificações na etapa de recuperação.

A condição de cultivo *in vitro* após a criopreservação (recuperação) constitui uma importante etapa para garantir a viabilidade dos materiais criopreservados. Fatores como

a intensidade luminosa e a composição salínica do meio de cultura, assim como concentração, tempo de exposição e natureza dos reguladores de crescimento utilizados, desempenham um papel crítico na resposta das culturas após a criopreservação. No presente estudo, foram avaliados dois desses fatores: a concentração e o tempo de exposição ao regulador de crescimento BAP. Vale ressaltar, que foram mantidas as condições de pré-tratamento e *loading* previamente descritas para os primeiros protocolos estabelecidos com a espécie, além de ser utilizada a solução PVS2 (25°C e 0°C) por diferentes tempos de exposição (0, 15, 30, 45, 60 e 90 min).

A atuação das citocininas, principalmente do BAP, na proliferação de brotos *in vitro* é amplamente conhecida. O efeito positivo da suplementação do meio de recuperação com citocininas vem sendo reportado em muitos estudos de criopreservação empregando diferentes técnicas (CANO-CASTILLO; CASAS, 2012; MANDAL et al., 2007; MARKOVIC et al., 2014; MATSUMOTO et al., 2014; MATSUMOTO et al., 2015b; NAIR et al., 2019; RAFIQUE et al., 2015; SANAYAIMA et al., 2006; WANG et al., 2014). Após a criopreservação, as células vegetais necessitam de um estímulo para retomar a divisão celular uma vez que, frequentemente, podem ocorrer alterações nos níveis hormonais endógenos devido ao estresse produzido durante o processo (WANG et al., 2003).

Sendo assim, os primeiros experimentos realizados neste trabalho visando à otimização do protocolo de criopreservação pela técnica de V-Crioplaca, utilizaram a redução (0,1 mg.L⁻¹) e o aumento (1,0 mg.L⁻¹) da concentração de BAP, quando comparados aos estudos anteriores, mantendo o tempo de exposição por 30 dias. O uso de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP resultou em baixos percentuais de recuperação independentemente do tratamento com PVS2. Entretanto, quando o mesmo regulador de crescimento foi utilizado na concentração de 1,0 mg.L⁻¹, houve um aumento da taxa de recuperação. Essa condição associada ao uso da PVS2 à temperatura ambiente por longos períodos (45, 60 e 90 min), resultou na hiperhidricidade dos brotos, uma desordem fisiológica, bioquímica e morfológica que ocorre devido ao acúmulo anormal de água no interior das células (VASCONCELOS et al., 2012), que imprime as características encontradas no material estudado. Por outro lado, quando a solução crioprotetora foi utilizada a 0°C, houve uma diminuição no desenvolvimento de brotos com aspecto hiperhídrico.

A suplementação do meio de cultivo com citocininas, principalmente se utilizadas em altas concentrações, vem sendo associada com a indução de hiperhidricidade (VASCONCELOS et al., 2012), que pode resultar em estresse oxidativo das culturas,

levando à diminuição da porcentagem de recuperação (HELOIR et al, 1997; PICOLI et al., 2001). Wang e colaboradores (2003) avaliaram o efeito da suplementação do meio de recuperação com BAP no desenvolvimento de ápices caulinares de cultivares de *Vitis* sp. e *Citrus*. sp. Embora para as espécies estudadas, o uso do regulador de crescimento tenha sido essencial para a recuperação, sua utilização a uma concentração superior a $4,4 \text{ mg.L}^{-1}$ favoreceu o desenvolvimento de brotos hiperhídricos.

Os efeitos indesejáveis de uma condição hiperhídrica podem ser minimizados mediante a redução da concentração ou do tempo de exposição aos reguladores de crescimento (VASCONCELOS et al., 2012). Desta forma, novos experimentos foram conduzidos com *C. spinosa*, nos quais o tempo de exposição dos ápices ao meio suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,1; 0,5; 1,0 mg.L^{-1}) foi reduzido para 15 dias.

A suplementação com uma menor concentração de BAP (0,1 mg.L^{-1}) por 15 dias, resultou nas menores taxas de sobrevivência e recuperação observadas em todo o estudo, demonstrando que o uso de concentração reduzida por um curto período de tempo não foi suficiente para estimular a proliferação celular nos ápices caulinares de *C. spinosa*. Em contrapartida, quando o meio de recuperação foi suplementado com 1,0 mg.L^{-1} de BAP por 15 dias, houve maior produção de brotos em relação à condição anterior. Além disso, a diminuição do tempo de exposição ao BAP favoreceu a qualidade fisiológica dos brotos desenvolvidos após a criopreservação, principalmente quando a PVS2 foi utilizada a 0°C .

Dentre todas as condições avaliadas, a utilização de uma concentração intermediária de BAP (0,5 mg.L^{-1}) por 15 dias, associada ao tratamento com PVS2 a 0°C , foi aquela que mais favoreceu a recuperação de ápices após a criopreservação. Empregando-se este protocolo, foi possível obter 83% de sobrevivência e 76% de recuperação, além de brotos fisiologicamente saudáveis. O uso de 0,5 mg.L^{-1} de BAP também estimulou a proliferação de brotos após a criopreservação de ápices caulinares de *Crateva nurvala*, Capparaceae, família botânica em que *C. spinosa* estava anteriormente inserida (SANAYAIMA et al., 2006). Entretanto os autores reportaram a formação de calos na base desses brotos.

Considerando os estudos com outra espécie do gênero *Cleome*, diferentemente do que foi observado para *C. spinosa*, a avaliação do efeito da concentração e do tempo de exposição ao BAP em *C. rosea*, não resultou em diferenças significativas na recuperação de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca (CORDEIRO et al.,

2015). Para esta espécie, a exposição a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP por sete dias, possibilitou que fossem alcançadas taxa de recuperação de 100%.

Os resultados obtidos com *C. spinosa* demonstraram que, independentemente da condição de recuperação avaliada, o uso da solução PVS2 a 0°C quando comparada à sua utilização à temperatura ambiente (25°C), favoreceu tanto a sobrevivência como a recuperação, principalmente considerando os ápices imersos em NL. A PVS2 é uma solução aquosa composta por crioprotetores que apresentam diferentes resistências em atravessar as membranas celulares. Os crioprotetores que compõem essa solução atuam em conjunto e promovem a desidratação dos explantes. Tal fato contribui para a sobrevivência a temperaturas criogênicas, uma vez que diminui a ocorrência de lesões teciduais devido à cristalização de moléculas de água (KIM et al., 2009).

Com relação aos componentes da PVS2, o alto peso molecular e a viscosidade conferem ao glicerol um baixo poder de penetração quando comparado ao DMSO e ao etilenoglicol (EG). Um estudo comparativo entre a toxicidade dos componentes das soluções crioprotetoras, realizado por Volk e colaboradores (2006), revelou que a taxa de difusão do glicerol é aumentada na presença de DMSO e EG. Entretanto, se a solução com glicerol for utilizada a 0°C seus efeitos tóxicos podem ser minimizados, já que a baixas temperaturas, a velocidade de penetração da PVS2 é menor devido à diminuição do poder de penetração do EG (SUZUKI et al., 2008; VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006).

Além da temperatura, a duração do tempo de exposição à solução de vitrificação também deve ser determinada de forma precisa para encontrar um equilíbrio entre a toxicidade e sua ação crioprotetora (VUJOVIĆ et al., 2011). Em geral, a exposição à PVS2 a 25°C por períodos prolongados, vem sendo apontada como um fator que afeta negativamente a recuperação de ápices criopreservados (KALITA et al., 2012; MENON et al., 2012). Tal fato pode ser atribuído ao aumento da velocidade de penetração quando utilizada à temperatura ambiente, o que pode ocasionar estresse osmótico ou toxicidade química. De forma antagônica, os tratamentos que envolvem o uso de PVS2 a 0°C geralmente requerem maiores tempos de exposição para atingirem níveis de desidratação adequados (MENON et al., 2012).

Para os ápices caulinares de *C. spinosa*, o aumento excessivo do tempo de exposição à PVS2 a 25°C , resultou em valores menos expressivos de sobrevivência e recuperação, para ápices imersos ou não em NL. Entretanto, quando a solução foi empregada a 0°C , o aumento do tempo de exposição favoreceu o incremento das taxas de

sobrevivência e recuperação. Assim como já observado em estudos anteriores com a espécie (VILARDO, 2015), os valores mais expressivos de sobrevivência e recuperação foram obtidos após os tratamentos com PVS2 a 0°C por 90 min. Essa mesma condição (PVS2 a 0 °C por 90 min) também favoreceu a recuperação de ápices de *C. rosea* criopreservados pela técnica de V-Crioplaca (CORDEIRO et al., 2015). Diversos trabalhos têm sido realizados visando investigar o efeito comparativo entre a temperatura e o tempo de exposição à PVS2 na criopreservação. O aumento do tempo de incubação em PVS2 a 0°C, também resultou em um efeito positivo na criopreservação de ápices caulinares de *Clinopodium odorum* (ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015). Já para ápices de *Perrilla frutescens*, o uso da solução a 0°C não foi favorável à criopreservação. Nesse caso, o maior percentual de recuperação encontrado (70%) foi utilizando a solução PVS2 a 25°C por 15 min (MATSUMOTO et al., 2014).

A outra técnica de criopreservação utilizada no presente trabalho, a D-Crioplaca, foi avaliada pela primeira vez para uma espécie da família Cleomaceae. Para o estabelecimento da técnica, foi investigada a redução do teor hídrico dos ápices a partir da exposição do material ao pré-cultivo com diferentes concentrações de sacarose e à sílica gel.

O pré-cultivo dos materiais em meio de cultura enriquecido com altas concentrações de açúcares, em geral a sacarose, normalmente é empregado antes das etapas de criopreservação. Esses solutos conferem à célula maior tolerância à dessecação e ao resfriamento, diminuindo o estresse mecânico causado pela etapa de desidratação subsequente (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Além disso, a sacarose atua mantendo a estabilidade das membranas celulares, já que é capaz de se ligar aos fosfolipídios, substituindo as moléculas de água (HELLIOT et al., 2003; ZHU et al., 2006). Salma e colaboradores (2014) avaliaram a influência do pré-cultivo na recuperação de calos poliembriogênicos de duas variedades de tamareiras criopreservadas pela técnica de D-Crioplaca. Os autores constataram que o uso do pré-cultivo em meio enriquecido com sacarose aumentou em até 20% a recuperação dos materiais para ambas as variedades testadas.

A avaliação do teor hídrico residual dos ápices de *C. spinosa* incubados em diferentes concentrações de sacarose permitiu selecionar a condição mais adequada para dar prosseguimento aos experimentos. O tratamento eleito foi aquele no qual os ápices foram expostos a concentrações crescentes de sacarose, 0,25 M - 0,5 M, permanecendo 24 h em cada concentração. Esse pré-tratamento resultou em 56% de teor hídrico residual

e em 100% de regeneração dos ápices. Embora outros tratamentos avaliados tenham resultado em valores residuais de teor hídrico ainda menores e tenham mantido a mesma taxa de regeneração, a qualidade dos brotos desenvolvidos foi determinante para a seleção do tratamento. Apenas no pré-cultivo descrito acima foi observado o desenvolvimento de brotos com aspecto fenotípico normal. Nos demais tratamentos, a exposição a altas concentrações de sacarose resultou em hiperhidricidade e formação de calo na base dos brotos.

Para muitas espécies, o pré-cultivo do material diretamente em meio contendo uma alta concentração de sacarose por longos períodos de tempo pode acarretar em efeitos deletérios à sobrevivência do material biológico (WANG et al., 2005). Para minimizar esses problemas e a fim de se obter uma desidratação mais lenta e gradual, podem ser aplicados pré-cultivos com aumento gradativo da concentração do açúcar. Desta forma, a exposição a uma menor concentração de sacarose, seguida do incremento da mesma, possibilita a adaptação dos ápices a estresses osmóticos intermediários antes das etapas de desidratação, resultando em melhores respostas fisiológicas (KIM; LEE, 2012).

Tendo em vista o seu papel na indução de tolerância à desidratação, optou-se pelo uso da solução de *loading* após o pré-cultivo em todos os tratamentos avaliados para a técnica de D-Crioplaca (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008). Muitos trabalhos sugerem que o tratamento prévio com uma solução de osmoproteção, antes da etapa de desidratação (osmótica ou evaporativa), pode minimizar danos ocasionados pela desidratação excessiva (ARIZAGA et al., 2016; NIINO et al., 2013; PENNYCOOKE; TOWILL, 2001). Matsumoto e colaboradores (2015b) constataram o efeito positivo do tratamento prévio com a solução de *loading* antes da etapa de desidratação evaporativa na recuperação de ápices caulinares de caqui após criopreservação pela técnica de D-Crioplaca. Neste estudo, a realização da etapa de exposição ao *loading* antes da dessecação em fluxo laminar, resultou em 96% de recuperação após a criopreservação. Para *C. spinosa*, a exposição ao *loading* auxiliou no processo de desidratação e material não apresentou sinais de oxidação.

A maioria dos trabalhos que emprega a técnica de D-Crioplaca utiliza a etapa de desidratação evaporativa em fluxo laminar, uma vez que a técnica foi originalmente estabelecida utilizando esta metodologia (NIINO et al., 2013). Entretanto, a taxa de desidratação nestas condições pode variar entre laboratórios devido a diferenças na temperatura ambiente, umidade relativa do ar, assim como as variações inerentes à velocidade do fluxo laminar (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008; NIINO et al., 2014). A

fim de minimizar esses problemas e tornar a técnica mais reprodutível, Niino e colaboradores (2014) realizaram um estudo comparativo entre a dessecação em fluxo laminar e em sílica gel e observaram uma correlação entre ambas as metodologias, principalmente quando se utilizam tempos bastante elevados. Sendo assim, os autores sugerem o uso da sílica gel para padronizar a etapa de desidratação. Então, para os estudos com *C. spinosa* optou-se pelo uso da dessecação em sílica gel.

Inicialmente os ápices foram avaliados quanto ao conteúdo hídrico residual e à capacidade regenerativa após as etapas de pré-cultivo, *loading* e exposição à sílica gel por diferentes períodos de tempo, sem imersão no NL. A partir das respostas de regeneração observadas, foram selecionados três tempos de dessecação em sílica gel (30, 60 e 90 min) nos quais a redução do conteúdo hídrico não comprometeu as taxas de regeneração, que se mantiveram elevadas.

Quando os ápices foram criopreservados, o tratamento por 60 min em sílica gel se mostrou o mais efetivo, alcançando 40% de sobrevivência e também de recuperação. De forma similar, Dhungana e colaboradores (2017), em seu estudo com ápices caulinares de *Vaccinium* sp., constataram que a associação do pré-cultivo, *loading* e exposição ao fluxo laminar por 60 min foram as melhores condições para a criopreservação pela técnica de D-Crioplaca. Contudo, em geral, as melhores condições para a criopreservação através de técnicas que utilizam desidratação evaporativa, como é o caso da D-Crioplaca, envolvem a dessecação por períodos muito mais extensos, podendo chegar a até 180 min (NIINO et al., 2013; NIINO et al., 2014; SALMA et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2015). O menor tempo requerido no presente trabalho pode estar associado às condições de pré-cultivo e ao método de desidratação empregados, uma vez que, normalmente, a desidratação utilizando sílica gel ocorre de forma mais rápida quando comparada àquela em fluxo laminar (NIINO et al., 2014).

Tendo em vista os primeiros resultados com a técnica de D-Crioplaca, novos experimentos foram delineados a fim de otimizar a taxa de recuperação do material. Dentre as alterações mais comuns e frequentemente associadas ao aumento das taxas de recuperação, estão aquelas relacionadas com as soluções de *loading* e de polimerização. Sendo assim, inicialmente, foram realizadas modificações no emprego da solução *loading*: mantendo a concentração de sacarose padrão e aumentando o tempo de exposição ou aumentando a concentração de sacarose e mantendo o tempo de exposição.

Muitos estudos envolvendo a técnica de D-Crioplaca associam o aumento da capacidade de recuperação dos materiais criopreservados com alterações na solução de

loading padrão (MATSUMOTO et al., 2015; NIINO et al., 2013; RAFIQUE et al., 2016; VALLE-ARIZAGA et al., 2016). Entretanto, para *C. spinosa*, as alterações no tempo de exposição e concentração da solução de *loading* resultaram em um efeito negativo na sobrevivência e recuperação de ápices criopreservados por meio da técnica de D-Crioplaca. Provavelmente, o aumento do tempo de exposição e/ou a concentração dos agentes crioprotetores presentes nessa solução promoveram uma desidratação excessiva do material, influenciando negativamente a eficácia do processo.

Dessa forma, optou-se por manter o uso da solução de *loading* padrão e realizar alteração na concentração de sacarose nas soluções de polimerização. Através de levantamento bibliográfico, foi possível traçar uma correlação entre a concentração de sacarose no meio de pré-cultivo e nas soluções de polimerização. De modo geral, as soluções de polimerização apresentavam uma concentração de sacarose 0,1 M superior àquelas empregadas no pré-cultivo (ARIZAGA et al., 2016; DHUNGANA et al., 2017; MATSUMOTO et al., 2015; NIINO et al., 2013; TANAKA et al., 2016; VUJOVIC et al., 2015). Sendo assim, nos experimentos subsequentes, a concentração de sacarose na solução de alginato de cálcio foi ajustada para 0,6 M. Essa condição associada a recuperação por 15 dias em meio suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP se mostrou a mais eficaz para a criopreservação de ápices caulinares de *C. spinosa* por essa técnica.

Os resultados alcançados com *C. spinosa* reforçam a eficácia das técnicas em Crioplacas de alumínio para a criopreservação do material vegetal. O uso das técnicas de V- e D-Crioplaca resulta no incremento das taxas de recuperação em diversas espécies (NIINO et al., 2013; SALMA et al., 2014; SEKIZAWA et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2012a; YAMAMOTO et al., 2015). Para *C. spinosa*, o uso das crioplacas também elevou as taxas de sobrevivência e recuperação alcançadas após a imersão em NL. Quando ápices caulinares de *C. spinosa* foram criopreservados pela técnica de Vitrificação, foram alcançados apenas 26% de recuperação (VILARDO et al., 2019). O uso das crioplacas possibilitou que fossem alcançadas taxas de recuperação até 70% e 76% para D- e V-Crioplaca, respectivamente.

A obtenção de maiores percentuais de recuperação do material criopreservado pelas técnicas em crioplacas, vem sendo diretamente relacionada com o aumento da eficiência dos processos de resfriamento e aquecimento (HIRAI, 2011). A alta condutividade térmica do alumínio, o contato direto com o NL e, no caso da V-Crioplaca, o pequeno volume de solução crioprotetora, são fatores que aumentam significativamente a probabilidade de se alcançar o estado vítreo (NIINO et al., 2013; YAMAMOTO et al.,

2011). Além disso, essas técnicas possibilitam executar com maior precisão as diversas etapas pelas quais os materiais são submetidos, facilitam a manipulação e favorecem o uso de um número maior de explantes por experimento (YAMAMOTO et al., 2011). Entretanto, a eficiência dos protocolos de criopreservação não depende somente da obtenção de elevadas taxas de sobrevivência e recuperação do material. Para que sejam efetivamente úteis, devem ser considerados também outros fatores, como a estabilidade genética e a manutenção do potencial biossintético, os quais validarão o uso da metodologia na conservação dos germoplasmas de interesse (NIAZIAN, 2019). Nesse sentido, o presente trabalho representa o primeiro estudo envolvendo análise molecular e fitoquímica, além da aclimatização de plantas desenvolvidas a partir de material criopreservado para o gênero *Cleome*.

Embora a criopreservação seja uma ferramenta que permite a conservação de germoplasmas vegetais em longo prazo, minimizando os riscos de perda da diversidade genética, os procedimentos empregados podem causar estresse e danos de diversas naturezas (físicos, químicos e fisiológicos) nos tecidos vegetais. Estes, muitas vezes, podem estar associados a diferentes fatores, tais como as etapas de cultivo *in vitro*, exposição à agentes de alta osmolaridade, imersão em NL e recuperação (HARDING, 2004) os quais podem causar efeitos negativos para a estabilidade genética do material e induzir variações somaclonais (AHUJA et al., 2002). Dessa forma, é importante que os protocolos de criopreservação sejam associados à avaliação da estabilidade genética dos materiais (AL-QURAINY et al., 2017; ANTONY et al., 2015; CHOUDHARY et al., 2013; LI et al., 2017). Tal avaliação pode ser realizada empregando marcadores morfológicos, moleculares e fitoquímico.

Dessa forma, buscou-se analisar as características morfológicas das plantas regeneradas dos estudos de criopreservação por meio do processo de aclimatização. A aclimatização consiste em diversos eventos que visam à transferência das plantas da condição de cultivo *in vitro* para condições *ex vitro*. No cultivo *in vitro*, as plantas apresentam fontes contínuas de carbono, sais minerais, vitaminas e alta disponibilidade hídrica de modo que a taxa fotossintética é muito reduzida (KUMAR; REDDY, 2011). Ao serem transferidas para condições *ex vitro*, estão sujeitas a uma grande variação de ambiente e de disponibilidade de recursos, o que pode acarretar na redução do crescimento ou desidratação do material. Tais respostas fisiológicas muitas vezes estão associadas à ausência de estômatos funcionais e reduzida capacidade de formação de cutículas cerosas (GUERRA; NODARI, 2006). Entretanto, para *C. spinosa*, foi obtida

uma taxa de 100% de aclimatização após 60 dias. Os resultados obtidos no presente estudo foram superiores aos de Albarello e colaboradores (2006) para a mesma espécie. Nesse estudo, os autores relatam que os brotos derivados de explantes hipocotiledonares, apresentaram 84% de aclimatização após igual período de tempo (ALBARELLO et al., 2006).

Além da taxa de aclimatização, outros dois fatores foram avaliados no presente estudo: a altura média das plantas e número de folhas desenvolvidas. Ao final de 60 dias, as plantas aclimatizadas de *C. spinosa* apresentaram uma variação média de 11cm de altura e 16 folhas. O aumento desses parâmetros foi proporcional ao tempo de cultivo *ex vitro*. Adicionalmente, após esse período, também foi evidenciado o aumento da superfície foliar. Tal fato relaciona-se com a questão de que é durante o processo de aclimatização que a planta começa a ativar seus fotossistemas 1 e 2, assim como ocorre a formação de cloroplastos. Moreira et al. (2006) afirmam que esses parâmetros são uma importante característica, pois mudas com maior número de folhas tendem a apresentar um maior índice de sobrevivência no campo, uma vez que estas são as estruturas responsáveis pela captação de energia solar e produção de compostos orgânicos por meio da fotossíntese.

O segundo marcador utilizado visando à análise da estabilidade genética em plantas foi o molecular. Essas técnicas requerem métodos rápidos e precisos para extração de DNA. O processo de extração de DNA consiste em duas etapas: na primeira etapa ocorre o rompimento das membranas celulares que resulta na liberação do DNA, processo que ocorre devido à adição de detergentes; e na segunda fase há a purificação do DNA em solução por meio de sucessivas etapas de lavagem que visam à separação do material de interesse dos componentes celulares da solução (ROMANO; BRASILEIRO, 2003). Neste estudo, buscou-se analisar três diferentes metodologias de extração de material genômico a fim de selecionar aquela que apresentasse o melhor rendimento e qualidade do DNA extraído. Foram avaliadas duas metodologias que utilizam o detergente CTAB (LANZA et al., 1997; HEALEY et al., 2014), o qual solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação, e o SDS (DELLAPORTA et al., 1983) que, em associação com altas concentrações de acetato de potássio, promove a precipitação simultânea de proteína e polissacarídeos.

O DNA extraído pelo método CTAB segundo Lanza e colaboradores (1997) apresentou um baixo rendimento, sendo evidenciada a presença de rastros ao longo do gel e fragmentos de baixo peso molecular. Tal fato pode estar associado a ocorrência de

contaminantes (RNA, proteínas, polissacarídeos, polifenóis) os quais podem se ligar ao DNA, comprometendo sua precipitação. Essas substâncias são reportadas na literatura como agentes que podem promover a degradação do DNA devido à oxidação e até mesmo inibir a ação de enzimas, como por exemplo, a DNA polimerase (MOLINARI; CROCHEMORE, 2001). A maioria dos protocolos visando à extração do DNA utilizam o protocolo CTAB padrão, ou com algumas modificações, visando resolver problemas específicos da espécie em estudo (ROMANO; BRASILEIRO, 2003; HEALEY et al., 2014), inclusive para *C. spinosa* (DOMYATI et al., 2011; GURU; SINGH; PURAK, 2017).

Tendo em vista principalmente a qualidade do DNA extraído, no presente estudo foi testado outro protocolo tendo como base o detergente SDS (DELLAPORTA et al., 1983). O uso dessa metodologia resultou em um rendimento inferior ao obtido com o CTAB padrão (LANZA et al., 1997), porém melhorou a qualidade do DNA extraído uma vez que não foi possível visualizar rastros e fragmentos de menor peso molecular. A diminuição do rendimento da extração, dentre outros fatores, pode estar associada às sucessivas etapas de purificação do DNA descritas no protocolo.

Além dos métodos propostos, também foi avaliado um protocolo de CTAB modificado (HEALEY et al., 2014) que vem sendo utilizado na literatura com sucesso, indicado às espécies consideradas recalcitrantes para as metodologias baseadas em CTAB padrão. Com esse protocolo foi possível obter uma quantidade considerável de DNA com expressiva qualidade associada. Tal técnica se baseia na utilização de uma alta concentração de NaCl, minimizando a extração de polissacarídeos complexos e substâncias fenólicas junto ao DNA. Além disso, este protocolo utiliza RNase em etapas iniciais (clorofórmio-álcool isoamílico) garantindo a remoção total da enzima ao longo do processo. A diminuição do número de etapas desse protocolo é uma outra vantagem associada, já que torna o procedimento mais rápido (HEALEY et al., 2014).

Para realizar a análise da estabilidade genética dos materiais criopreservados, foram utilizadas duas técnicas de marcadores moleculares, SCoT e ISSR, que permitem uma varredura do genoma de forma relativamente simples, rápida, de baixo custo, sem haver necessidade do conhecimento prévio do genoma. O marcador SCoT por ter seus *primers* baseados em sequências que flanqueiam regiões codificadoras no genoma, associadas a genes funcionais, é uma técnica bastante robusta (COLLARD; MACKILL, 2009). Já o marcador ISSR consegue varrer grande parte do DNA uma vez que seu *primer* é baseado em regiões de microssatélites amplamente distribuídas no genoma

(ZIETKIEWICZ et al., 1994). Essas técnicas vêm sendo utilizadas em estudos visando a monitoramento da estabilidade genética de plantas regeneradas a partir de sistemas de cultivo *in vitro* (AGARWAL et al., 2016; AL-QURAINY et al., 2017; BI et al., 2016; BHATIA et al., 2011; MUTHUKUMAR; KUMAR; RAO, 2016; RATHORE et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

A escolha do marcador molecular, deve considerar, entre outros fatores, a reprodutibilidade da técnica (KUMAR et al., 2009). Estudos mostram que o tamanho do *primer*, assim como sua temperatura de anelamento na reação de PCR, são importantes fatores associados a essa característica. *Primers* maiores, contendo 16 - 24 nucleotídeos, ou que apresentem uma grande porcentagem de bases CG normalmente requerem temperaturas de anelamento mais elevadas e tendem a ser mais reprodutíveis (JOHNSON; CLABOT, 2000). Os *primers* de SCoT e ISSR utilizados no estudo variaram de 11 - 18 nucleotídeos, apresentando um tamanho considerável. Todos foram testados em amostras de DNA distintas e apresentaram o mesmo padrão de fragmentos gerados, corroborando a reprodutibilidade das técnicas.

Visando à obtenção de melhores resultados e à economia de recursos, ambas as técnicas foram padronizadas quanto às condições das reações de PCR para *C. spinosa*, principalmente no que diz respeito à temperatura de anelamento dos *primers*. Collard e Mackill (2009) recomendam que a etapa de anelamento nas reações de PCR para a técnica SCoT seja realizada à temperatura de 50 °C, uma vez que todos os iniciadores apresentam o mesmo tamanho. Entretanto, ressaltam que é necessário realizar adequações para a espécie em estudo, pois a temperatura descrita para determinado *primer* nem sempre é funcional para todas as espécies. No caso de *C. spinosa*, a temperatura de anelamento que resultou em uma maior quantidade de fragmentos e, portanto, selecionada para dar continuidade com os experimentos empregando o marcador SCoT foi 48°C. Para os *primers* de ISSR, como apresentavam tamanho e composição variável, foram realizados alguns testes com temperaturas crescentes iniciando a 40°C, temperatura previamente utilizada com sucesso para a amplificação desses *primers* (DOMYATI et al., 2011). Neste caso, buscou-se investigar o efeito de temperaturas mais elevadas na amplificação, uma vez que quanto maior a temperatura de anelamento, maior é a interação entre o *primer* e o fragmento de DNA (JOHNSON; CLABOT, 2000). Dessa forma, os experimentos de ISSR foram realizados a 45°C.

Os ensaios visando à análise da estabilidade genética de plantas de *C. spinosa* recuperadas após a criopreservação pelo método de V-Crioplaca foram realizados através

da comparação de um mesmo germoplasma vegetal submetido aos tratamentos de criopreservação (-NL e +NL) em comparação com sua planta matriz.

As análises pela técnica SCoT resultaram em um total de 2619 fragmentos com um alto grau de bandas monomórficas (99,97%). Dos dez primers avaliados, apenas um fragmento polimórfico foi evidenciado considerando nove grupos de plantas analisados. Similarmente, Al-Qurainy e colaboradores (2017), também constataram uma baixa variação genética ao investigarem plântulas desenvolvidas após a criopreservação de calos embriogênicos.

A maioria dos trabalhos que avaliam a estabilidade genética após a criopreservação não encontram variações nos regenerantes. Normalmente, quando alguma diferença é encontrada, a causa é atribuída ao processo de cultivo e regeneração *in vitro* associados ao processo de criopreservação (MARTÍN; GONZÁLEZ-BENITO, 2005; WANG et al. 2014). No presente estudo, o polimorfismo foi revelado na amostra -P5, podendo ser resultado das etapas de cultivo *in vitro* e/ou tratamento visando a desidratação. Tal alteração, provavelmente, não está associada a imersão em NL visto que a amostra +P5 não apresentou o referido fragmento. A técnica SCoT, em associação com outro marcador molecular, também foi utilizada para analisar a estabilidade genética de protocormos de orquídea criopreservados. A partir das análises, foi possível observar que pelo menos quatro primers apresentaram fragmentos polimórficos para ambos os tratamentos, -NL e +NL. Dessa forma, os autores enfatizam que tal variação não foi causada pela imersão em NL e sim devido ao cultivo *in vitro* associado às etapas de criopreservação (ANTONY et al., 2015).

As análises pela técnica ISSR resultaram em um total de 4347 fragmentos bem definidos e homogêneos, sendo todos monomórficos. É importante destacar que no presente estudo, foram utilizados primers ISSR ancorados, os quais se pareiam em regiões específicas do DNA, produzindo bandas com boa resolução (REDDY et al., 2002). Similarmente, na análise da estabilidade genética de plantas de amora (*Morus* sp.), desenvolvidas a partir de gemas dormentes criopreservadas, foi alcançado 100% de fragmentos monomórficos (CHOUDHARY et al., 2013). Zhang e colaboradores (2015) também empregaram a técnica de ISSR em associação com outro marcador molecular. A partir dos primers avaliados, não foram evidenciados fragmentos polimórficos em plantas regeneradas a partir de ápices criopreservados. Outro estudo de fidelidade genética foi realizado com *Fragaria vesca* após a criopreservação, utilizando três marcadores moleculares distintos. Uma das 16 plantas avaliadas após a criopreservação apresentou

uma banda polimórfica na amplificação com um dos marcadores moleculares. Entretanto, os autores enfatizam que esta resposta representa uma pequena porcentagem do total de fragmentos analisados, ressaltando que o processo de criopreservação pode ser considerado eficiente (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016).

A associação das duas técnicas de marcadores moleculares utilizadas para *C. spinosa* oferece um maior respaldo quanto aos resultados obtidos (MARTÍN et al. 2011). Entretanto, algumas alterações genéticas (pontos de mutações raros, presenças de cópias extra de alguns genes, variação no número de cromossomos etc.) podem não ser detectadas por marcadores moleculares. Isso se deve ao fato de que essas técnicas não são capazes de avaliar o genoma em sua totalidade. (HARDING, 2004; MARTÍN; GONZÁLEZ-BENITO, 2005). Sendo assim, o uso de um único marcador molecular pode subestimar a possibilidade de instabilidade genética, tornando necessária a associação entre dois ou mais marcadores.

Além da avaliação da estabilidade morfológica e molecular, é interessante também realizar a estabilidade metabólica (avaliação fitoquímica) dos materiais submetidos aos procedimentos de criopreservação, sobretudo quando se trata de espécies medicinais de uso popular, como é o caso de *C. spinosa*. Estudos visando à investigação da capacidade de manutenção da produção de substâncias bioativas em plantas regeneradas após o processo de criopreservação vêm crescendo nas últimas décadas (AHUJA et al., 2002; BI et al., 2016; DIXIT-SHARMA et al. 2005; KRISHNAN et al. 2011; MEDINA; CASAS, 2013; SKYBA et al. 2010).

A análise fitoquímica da espécie *C. spinosa* com a finalidade de se comparar extratos obtidos de plantas *in vivo* (PV), propagadas *in vitro* mantidas em estoque (PE) e regeneradas a partir do processo de criopreservação (PC) foi realizada pela primeira vez no presente trabalho. Para a obtenção dos extratos, foi empregado o método de extração por maceração uma vez que este já havia sido reportado para a espécie (ALBARELLO et al., 2011). Nesta técnica, o material vegetal é submetido à extração por exaustão com o solvente o qual permanece em contato direto com o vegetal por período determinado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O extrato obtido de plantas *in vivo*, embora tenha resultado de um peso de matéria fresca inferior, apresentou um maior rendimento quando comparado àqueles obtidos de plantas cultivadas *in vitro*. Além disso, esse extrato também diferiu dos demais quanto à sua coloração a qual se apresentou esverdeada. Tal característica provavelmente foi evidenciada em virtude do maior teor de clorofila existente nas plantas mantidas *in vivo*,

já que a manutenção da mesma sob condições *in vitro* reduz significativamente a taxa fotossintética (GUERRA; NODARI, 2006).

As análises por CLAE-DAD-UV foram realizadas a fim de determinar um perfil de *fingerprint* para a espécie. Inicialmente foi realizada a análise em 254 nm já que é um comprimento de onda capaz de ser absorvido por uma vasta variedade de moléculas (PAVIA et al., 2012). Essas análises revelaram que a planta *in vivo* (PV) apresenta uma grande diversidade de sinais os quais foram detectados ao longo de toda a corrida de modo homogêneo. Ao passo que para os materiais cultivados *in vitro* (PE e PC), foi possível encontrar algumas faixas em que esses sinais se concentravam. Tal fato pode estar relacionado ao ambiente em que esses organismos estão cultivados. Na condição *in vivo*, a planta está suscetível a uma série de fatores bióticos e abióticos que modulam a síntese de metabólitos especiais. A alta intensidade luminosa da luz solar, variações sazonais, intempéries e pragas são fatores que podem favorecer a síntese de uma maior diversidade de metabólitos especiais encontrados nesses materiais (GANDHI et al., 2015; JIMENEZ-GARCIA et al., 2013).

O perfil de *fingerprint* similar tanto para PE como PC foi corroborado através da análise estatística tomando como parâmetro o coeficiente de similaridade de Jaccard. Tais amostras compartilham uma grande quantidade de sinais, resultando em um alto índice de similaridade. Já a amostra PV, apresentou uma ampla diversidade nos sinais encontrados e, portanto, foi a que mais diferiu dos demais. Esses dados indicam que os tratamentos de criopreservação aos quais os ápices foram submetidos não acarretaram uma variação na composição química desses materiais. Plantas de *Chrysanthemum morifolium* desenvolvidas a partir de material criopreservado e posteriormente aclimatizadas também tiveram seu perfil de *fingerprint* comparado com suas plantas matrizes de origem via análises cromatográficas (BI et al., 2016). Assim como evidenciado em *C. spinosa*, os extratos das plantas oriundos dos dois sistemas de cultivo *in vitro* (estoque e criopreservado) também apresentaram perfis de *fingerprint* similares.

Em seguida, buscou-se analisar os cromatogramas obtidos em 480 nm, um comprimento de onda mais excludente. A partir da análise do tempo de retenção associado à polaridade das moléculas e aos espectros de absorção em UV foi possível observar diversos sinais que caracterizaram a presença de carotenoides, substâncias lipofílicas pertencentes ao grupo dos terpenos (KIOKIAS, PROESTOS; VARZAKAS, 2016). Tais metabólitos são constituídos por uma longa cadeia insaturada e, por este motivo, apresentam alta absorbância, geralmente superior a 350 nm (PAVIA et al., 2012).

A presença de substâncias do grupo dos terpenos tem sido observada em vários estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Cleome* (ABULLAH et al., 2016; SINGH; MISHRA; MISHRA, 2018). Terpenoides em *C. spinosa* já foram reportados na literatura anteriormente. Diversos sesquiterpenos e diterpenos oxigenados foram revelados nos 125 perfis fitoquímicos de extratos de partes aéreas da espécie analisados por CG-EM (MCNEIL et al., 2010). Substâncias pertencentes ao grupo dos carotenoides também foram encontradas em calos e cultura de células em suspensão de *C. spinosa* (ALBARELLO et al., 2007). Em outra espécie do gênero, *C. rosea*, análises por CCD e CLAE-EM revelaram a presença de substâncias pertencentes a classe dos terpenos em extratos preparados a partir de caule, folha e inflorescência de planta obtida em ambiente natural, e em culturas de raízes produzidas *in vitro* (CORDEIRO, 2016).

A partir da análise dos cromatogramas obtidos em 340 nm e dos espectros de absorção foi possível identificar também substâncias pertencentes a classe dos flavonoides. Esses espectros de absorção apresentaram dois e três picos de absorbância, os quais se relacionam diretamente com a estrutura química da molécula do flavonoide (PAVIA et al., 2012). Substâncias pertencentes às subclasses favanona, dihidroflavonol ou flavadiol, por exemplo, apresentam menos ligações insaturadas em suas moléculas e, conseqüentemente, possuem apenas um núcleo de ressonância fazendo com que sua absorbância máxima seja na faixa de 280-290 nm. Já em substâncias pertencentes às subclasses flavona e flavonol, a presença de mais ligações duplas em suas moléculas aumenta a quantidade de núcleos de ressonância, o que se reflete na absorbância no UV (faixa de 360 nm) (PAVIA et al., 2012; SELLEM et al., 2017).

Os flavonoides observados nas amostras estoque (PE) e criopreservada (PC) concentraram-se nos primeiros 20 minutos de corrida, ao passo que aqueles encontrados na amostra de campo (PV) foram distribuídos ao longo de 40 minutos de corrida. Esses dados sugerem que, possivelmente, as plantas propagadas *in vitro* (PE e PC) apresentam um maior teor de compostos naturais glicosilados, os quais tendem a apresentar alta polaridade, enquanto a amostra de campo (PV) possui um maior teor desses compostos livres (agliconas), que normalmente se caracterizam por uma menor polaridade (PAVIA et al., 2012; SELLEM et al., 2017).

Os flavonoides estão inclusos no grupo das substâncias fenólicas que abrange uma gama de outros metabólitos muitos com propriedade terapêutica (KHADEM et al., 2010; KHODDAMI et al., 2013). Essas substâncias são frequentemente associadas a um amplo espectro de efeitos promotores de saúde, podendo ser encontradas em produtos

nutracêuticos, farmacêuticos e cosméticos. Muitos estudos apontam o uso de flavonoides contra doenças neurodegenerativas e de origem inflamatória, podendo também ser utilizados no tratamento de câncer, dentre outras enfermidades. Muitos desses efeitos biológicos estão associados com sua capacidade de modular a atividade enzimática e a sua grande capacidade antioxidante (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016)

Diversos estudos fitoquímicos já relataram a presença de flavonoides em espécies do gênero *Cleome*, tanto na forma glicosídica quanto aglicona (ABDULLAH et al., 2016). A presença de flavonoides já foi reportada para *C. spinosa* em extratos preparados a partir de parte aérea, sendo associados com o potencial antioxidante (COLLINS et al., 2004; LEAL et al., 2007).

Muitos estudos de conservação em longo prazo associam marcadores morfológicos, moleculares, fitoquímicos para a avaliação da eficiência do processo (BI et al., 2016; KAITTY; DREW; ASHMORE, 2013; ZHANG et al., 2015). Plantas desenvolvidas a partir de ápices caulinares criopreservados de *Chrysanthemum morifolium* foram avaliadas molecular, fitoquímica e morfológicamente em comparação com suas plantas matrizes. Similarmente ao encontrado com *C. spinosa*, não foram evidenciadas diferenças entre os indivíduos analisados quanto aos três parâmetros empregados (BI et al., 2016).

Os resultados alcançados na criopreservação de *C. spinosa* demonstram a viabilidade das técnicas empregadas para a conservação em longo prazo dos materiais biotecnológicos estabelecidos para a espécie as quais foram certificadas pelo uso de diferentes marcadores genéticos.

CONCLUSÕES

- ✓ A concentração de BAP, assim como o tempo de exposição no meio de recuperação foi determinante à sobrevivência e regeneração dos ápices criopreservados pela técnica de V-Crioplaca;
- ✓ A temperatura e o tempo de exposição à PVS2 foram fatores importantes para a recuperação dos ápices criopreservados por V-Crioplaca, principalmente quando utilizada a combinação 0 °C por 90 minutos;
- ✓ O protocolo mais eficiente para a criopreservação de ápices por V-Crioplaca envolveu o pré-cultivo em concentrações crescentes de sacarose (0,25M - 0,50M), *loading* (20 min), PVS2 à 0°C (90 min) e recuperação em MS + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (15 dias);
- ✓ Para os protocolos em D-Crioplaca, o cultivo dos ápices em meio contendo concentrações crescentes de sacarose (0,25M - 0,50M) por 48 horas mostrou-se a condição de pré-cultivo mais eficiente quanto à redução do conteúdo hídrico associada à manutenção da capacidade regenerativa;
- ✓ A exposição à sílica gel de 30 a 90 min não reduziu a capacidade regenerativa dos ápices não resfriados;
- ✓ A exposição dos ápices à sílica gel por 60 minutos mostrou-se a condição de dessecação mais eficiente para a recuperação quando empregada a técnica de D-Crioplaca;
- ✓ As alterações na solução de *loading* apresentaram efeito negativo na recuperação de ápices criopreservados por meio da técnica de D-Crioplaca;

- ✓ O aumento da concentração de sacarose na solução de alginato de cálcio influenciou positivamente a recuperação de ápices criopreservados por meio da técnica de D-Crioplaca;
- ✓ A diminuição do tempo de cultivo em BAP favoreceu a recuperação de ápices criopreservados por D-Crioplaca;
- ✓ O protocolo mais eficiente para a criopreservação de ápices por D-Crioplaca envolveu o pré-cultivo em concentrações crescentes de sacarose (0,25M - 0,50M), aderência à Crioplaca com alginato de cálcio a 0,6 M de sacarose, *loading* (20 min), dessecação em sílica gel por 60 min e recuperação em MS + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (15 dias);
- ✓ A aclimatização das plantas desenvolvidas a partir de ápices criopreservados permitiu o desenvolvimento de plantas saudáveis, morfologicamente semelhantes às cultivadas *in situ*;
- ✓ O uso dos marcadores moleculares SCoT e ISSR revelaram um alto grau de fragmentos monomórficos para as plantas desenvolvidas a partir de ápices criopreservados, imersos ou não em NL, em comparação com suas respectivas plantas matrizes;
- ✓ As análises cromatográficas mostraram que o processo de criopreservação não alterou o perfil fitoquímico das plantas regeneradas, quando comparado ao perfil das plantas estoque mantidas em *in vitro* e daquelas cultivadas *in situ*, com destaque para a presença de carotenoides e flavonoides;
- ✓ Os resultados aqui alcançados corroboraram a viabilidade das técnicas de criopreservação empregadas na conservação em longo prazo de ápices caulinares de *C. spinosa* garantindo a manutenção de materiais biotecnológicos da espécie.

PERSPECTIVAS

Em função dos resultados obtidos nas análises cromatográficas que demonstraram a presença de flavonoides nos extratos preparados com plantas das três origens (PV, PE e PC), novos estudos serão realizados visando avaliar o potencial antioxidante desses materiais. Essas avaliações serão realizadas empregando diferentes testes, como por exemplo, a captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•), avaliação da atividade quelante de ferro e peroxidação lipídica.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, W., et al. Chemical Constituents and Biological Activities of Cleome Genus: A Brief Review. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. v. 8, n. 6, p 777-787, 2016.
- AGARWAL, T., et al. Organogenesis and evaluation of genetic homogeneity through SCoT and ISSR markers in *Helicteres isora* L., a medicinally important tree. *South African Journal*. v. 106, p. 204-210, 2016.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular markes techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell Reports*, v. 27, p. 617-631, 2008.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.1, p.114-140, 2007.
- AHMED, Z.F. *et al.* Naturally occuring glucosinolates with special reference to those of family Capparidaceae. *Planta Medica*, v.21, n.2, p. 35-60, 1972.
- AHUJA, S. et al. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea foribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. *Plant Science*. v. 163, p. 971–977, 2002.
- ALBARELLO, N. Aplicação de métodos biotecnológicos para estudos fitoquímicos e farmacológicos de *Cleome spinosa* Jacq. (Capparaceae). Tese de doutorado, UERJ, Rio de Janeiro, 2005.
- ALBARELLO, N. et al. *In vitro* propagation of *Cleome spinosa* (Capparaceae) using explants from nursery-grown seedlings and axenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, v.43, p.601-606, 2006.
- ALBARELLO, N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of field-growth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. *Journal of Medical Plant Reserch*, v.7, n.16, p1043-1049, 2013.
- ALBARELLO, N. et al. Histological analysis of calluses from *in vitro* propagated plants of *Cleome spinosa* Jacq. *Brazilian Journal of Biosciences*, v.5, n.2, p.699-701, 2007.
- AL-QURAINY, F., et al. Assessing genetic fidelity in regenerated plantlets of date palm cultivars after Cryopreservation. *Fresenius Environmental Bulletin*. v. 26, n.2, p. 1727-1735, 2017.
- ANDRADE, F. D., et al. Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcóolico da raiz da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. no controle de *Haemonchus contortus* em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 34, 2014.
- ANTONY, J. J. J., et al. Somaclonal variations were not induced by the cryopreservation: Levels of somaclonal variations of *in vitro* and thawed protocorms

of *Dendrobium Bobby Messina* analysed by SCoT and TRAP DNA markers. *South African Journal of Botany*. v. 100, p. 148–157, 2015.

APARADH, V.T.; MAHAMUNI, B. A.; KARADGE, R.J. Taxonomy and Physiological Studies In Spider Flower (Cleome species): A Critical Review. *Plant Sciences Feed*. v.3, n.3, p. 25-46, 2012.

ARIAZAGA, M. V., et al. Improvement to the D Cryo-plate Protocol Applied to Practical Cryopreservation of In Vitro Grown Potato Shoot Tips. *The Horticulture Journal*, v 2, p. 222-228, 2017.

BAIRU, M.W., AREMU, A.O.; STADEN, J.V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulators*, v.63, p.147-173, 2011.

BECKER, T.M.; JUVIK, J.A. The role of glucosinolate hydrolysis products from Brassica vegetable consumption in inducing antioxidant activity and reducing cancer incidence. *Diseases*, v.4, n.2, p. 22 2016.

BELLE R.S.; BELAUBRE, T.V. *Cleome spinosa* extract used in pharmaceutical preparations and cosmetic compositions. US8,007,836B2. Aug.30, 2011.

BELOKUROVA, V. B. Methods of Biotechnology in System of Efforts Aimed at Plant Biodiversity Preservation (Review). *Cytology and Genetics*, v. 44, n. 3, p. 174–185, 2010.

BENSON, E.E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. M. (Ed.) *Plant Cryopreservation - A Practical Guide*. New York, USA: Springer, p.15-32, 2008.

BENSON, E.E., et al. Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Ed.) *Plant Tissue Culture Engineering*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, p. 441-475, 2006.

BENSON, E.E.; BREMNER, D.H. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. (eds). *Life in the frozen state*. Boca Raton: CRC Press; p. 206–41, 2004.

BHATIA, R., et al. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. v. 104, p. 131–135, 2011.

BHOITE, H.A.; PALSHIKAR, G.S. In vitro Plant Propagation: A Review. *world Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.27. n 2. p. 61-72, 2011.

BI, W. L.; PAN, C.; LIU, J.; WANG, Q. C. Greenhouse performance, genetic stability and biochemical compounds in *Chrysanthemum morifolium* ‘Hangju’ plants. *Acta Physiol. Plant*, v. 38, p. 268, 2016.

BRASIL. Lei Federal N° 9.985, de 18 de julho de 2000. Institui o sistema nacional de unidades de conservação da natureza e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 19 jul. 2000, p.1.

CABRAL, S.C.M.; AGRA, M.F. Etnomedicina e farmacobotânica das Capparaceae da caatinga paraibana, Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.79, p.2-6, 1998.

- CANO-CASTILLO, M.; CASAS, J.L. Development of a vitrification-based cryopreservation protocol for the storage of Saltcedar (*Tamarix boveana* Bunge). *CryoLetters*, v. 33, n.3, p. 181-189, 2012.
- CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande. EMBRAPA Algodão (Boletim técnico - Documento, 115), 24p, 2003.
- CASTRO, S. V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 39, n. 2, p. 1-18, 2011.
- CASTRO, T. C. et al. Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and *in vivo* and *in vitro* germination of species of the genus *Cleome*. *Journal of Seed Science*, v.36, n.3, p.326-335, 2014.
- CHAROENSUB, R.; HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava by Encapsulation-Vitrification method. *CryoLetters*, v.25, n.1, p. 51-58, 2004.
- CHOUDHARY, R., et al. Genetic stability of mulberry germplasm after cryopreservation by two-step freezing technique. *African Journal of Biotechnology*. v. 12, p 5983-5993, 2013.
- COLLARD, B.C.Y.; MACKILL, D.J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. v. 27, p. 86–93, 2009.
- COLLARES, F.P.; KIECKBUSCH, T.G.; FINZER, J.R.D. Revisão: A Transição Vítrea em Produtos Alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 5, p. 117-130, 2002.
- COLLINS, C.H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. (Orgs). *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.
- COLLINS, D.O. et al. New Cembranes from *Cleome spinosa*. *Journal of Natural Products*, v.67, p.179–183, 2004.
- CONCEIÇÃO, G.M. et al. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. *Scientia Plena*, v. 7, n. 12, 2011.
- COOKE, T. *Flora of the Presidency of Bombay* Vol II (publ.) Botanical Survey of India. p. 42-43, 1903.
- CORDEIRO, L.S. Criopreservação de ápices caulinares e raízes produzidos *in vitro* e avaliação fitoquímica de *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Cleomaceae). Tese de doutorado, UERJ, Rio de Janeiro, 2016.
- CORDEIRO, L.S. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* . v. 51, p. 688–695, 2015.

- CORDEIRO, L.S.; SIMÕES-GURGEL, C; ALBARELLO. Cryopreservation of adventitious roots of *Cleome rosea* vahl (cleomaceae) using a vitrification technique and assessment of genetic stability. *CryoLetters*. v. 37, n. 4, p. 231-242, 2016.
- COSTA-E-SILVA, M.B. O gênero *Cleome* L. (Capparaceae Juss.) para o Brasil. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Botânica - Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Pernambuco. f.153, 2000.
- CRUZ-CRUZ, C.A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. *Resources*, v. 2, p. 73-95, 2013.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, p.19-21, 1983.
- DHUNGANA, S.A. Cryopreservation of blueberry shoot tips derived from in vitro and current shoots using D cryo-plate technique. *Plant Biotechnology*. v.34, p. 1-5, 2017
- DIXIT-SHARMA, S., et al. Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea*—an endangered medicinal plant. *Scientia Horticulturae*. v. 105, p. 513–517, 2005.
- DOMYATI, F.M. et al. Molecular markers associated with genetic diversity of some medicinal plants in Sinai. *Journal of Medicinal Plants Research*. v. 5, n. 2, p 200-210, 2011.
- ELLIOTT, G.D.; WANG, S.; FULLER, B.J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, v. 76, p. 74-91, 2017.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Development and Biology*, v.47, p.5-16, 2011.
- ENGELMANN-SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Clinopodium odorum* using aluminium cryo-plates. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 51, n.1, 2015.
- FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryoletters*, v.11, p.413-426, 1990.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*. v. 23, p. 1-13, 1986.
- FALEIRO, F.G. *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Embrapa, 102p., 2007.
- Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. UFRGS, 5ª ed., 2004.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Brasil. 5ª edição. *Brasília: Anvisa*, 2010. 546 p.

- GANDHI, S.G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y.S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta*. v. 241, n. 2, p. 303-317, 2015.
- GANDHI, S.G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y.S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta*. v. 241. p.303–317, 2015.
- GANTAIT, S. et al. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. *Protoplasma*. v. 252, p. 89–101, 2015.
- GERY, C. et al. Natural variation in the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*: Effects of RNAi-induced CBF depletion and QTL localisation vary among accessions. *Plant Science*, v. 180, p.12-23, 2011.
- GONZALEZ-ARNAO, M.T., et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. v. 92, p. 1-13, 2008.
- GONZALEZ-ARNAO, M.T., et al. ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v. 92, p. 1-13, 2008.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. *Apostila de Biotecnologia - Cultura de tecidos vegetais*. CCA/UFSC. Steinmacher, p.1-41, 2006.
- GURU, S.D.; SINGH, A.; PURAK, I. Studies on DNA Isolation, Quantitative Estimation and RAPD analysis of *Cleome spinosa* Jacq. and *Cleome gynandra* Linn. of the family Cleomaceae. *Vegetos*, v. 30, p. 149-154, 2017.
- HALL, J.C.; SYTSMA, K.J.; ILTIS, H.H. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence date. *American Journal of Botany*, v.89, n.11, p.1826-1842, 2002.
- HAN, X. et al. Measurement of the apparent diffusivity of ethylene glycol in mouse ovaries through rapid MRI and theoretical investigation of cryoprotectant perfusion procedures. *Cryobiology*. v. 58, p. 298-302, 2009.
- HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. *CryoLetters*, v. 25, p. 3-22, 2004.
- HASSLER, M.L. The importance of the units of conservation in Brazil. *Sociedade & Natureza*. v.17,n.13, p.79-89, 2005.
- HEALEY, A., et al. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, v:10, 9 p., 2014.
- HELLIOT, B. et al. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Reports*, v. 21, p. 690-698, 2003.

- HELOIR, M.C. et al. An improved procedure for the propagation in vitro of grapevine (t *Vitis vinifera* cv. *Pinot noir*) using axillary-bud microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v.49, n. 3, p. 223-225, 1997.
- HEYWOOD, V.H.; DULLOO, M.E. *In situ conservation of wild plant species: a critical global review of best practices*. Roma: IPGRI. IPGRI Technical Bulletin, n.11, 2005
- HIRAI, D. Gelled droplet vitrification improves recovery of Cryopreserved potato germplasm. *Cryoletters*. v. 32, n. 4, p. 287-296, 2011.
- HOOKE, J.D; THOMSON, T. *Cleome* In: HOOKE, J. D. (Eds.) *The Flora of British India*, L. Reeve & Co. London. p. 168-170, 1872.
- HUSSAIN, S. et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, v. 4, n. 1, p. 10, 2012.
- ILIEV, I. et al. Plant micropropagation. In: DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. *Plant cell culture: essential methods*. 1^a ed. Inglaterra: Wiley-blackwell, 2010.
- ILTIS, H.H. et al. Studies in the Cleomaceae : On the separate recognition of Capparaceae, Cleomaceae, and Brassicaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.98, p.28–36, 2011.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). *Guidelines on the Management of Ex Situ Populations for Conservation*. Approved at the 14th Meeting of the Programme Committee of Council, Gland Switzerland, 2002.
- ISAH, T., et al. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. v.132, p. 239–265, 2018
- JAIN, K.J.; PAULSON, R.J. Oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility*. v. 86. n.3. p. 1037-1046, 2006.
- JIANG, G.L. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants In: ANDERSEN, S.B (Eds.) *Plant breeding from laboratories to fields*. InTech. p. 45–83, 2013.
- JIMENEZ-GARCIA, S. N., et al. Current approaches for enhanced expression of secondary metabolites as bioactive compounds in plants for agronomic and human health purposes – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 63, n. 2, p. 67-78, 2013.
- JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C. Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. v. 7, p 258–264, 2000.
- JUNGHANS, T.G; SOUZA, A. da S. Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Cruz das Almas, Bahia. *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, , 1^a Ed p.324-331, 2009.

- KAITY, A.; DREW, R.A.; ASHMORE, S.E. Genetic and epigenetic integrity assessment of acclimatized papaya plants regenerated directly from shoot-tips following short- and long term cryopreservation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. v. 112, p. 75–86, 2013.
- KALAISELVI, R.; RAJASEKAR, M.; GOMATHI, S. Criopreservation of Plant Materials - A Review. *International Journal of Chemical Studies*, v.5, n.5, p. 560-564, 2017.
- KALITA, V. et al. Vitrification-based cryopreservation of shoot-tips of *Pinus kesiya* royle ex. gord. *CryoLetters*, v.33, n.1, p. 58-68, 2012.
- KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L.; MROGINSKI, L.A. In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. v. 107, p. 133-140, 1982.
- KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*, v.5, p.778-800, 2011.
- KELLER, E.R.J.; DREILING, M. Potato cryopreservation in Germany-using the droplet method for the establishment of a new large collection. *International Society for Horticultural Science*, 2002.
- KELLER, E. R. J. et al. Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 60, p. 913- 926, 2013.
- KHADEM, S.; MARLES, R. J. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*, v. 15, p.7985-8005, 2010.
- KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. v. 18, p. 2328-2375, 2013.
- KIM, H. et al. Development of a alternative plant vitrification solutions in Droplet-Vitrification procedures. *CryoLetters*, v. 30, n. 5, p 320-334, 2009.
- KIM, H.; LEE, S. Personalisation' of droplet-vitrification protocols for plant cells: a systematic approach to optimising chemical and osmotic effects. *CyoLetters*, v. 33, n.4, p. 271-279, 2012.
- KIOKIAS, S.; PROESTOS, C.; VARZAKAS, T. A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science*. v.4, n. 1, p. 25-37, 2016.
- KRISHNAN, P.N.; DECRUSE, S.W.; RADHA, R.K. Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through in vitro technology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. v. 47, p. 110–122, 2011.
- KUMAR, N.; REDDY, M.P. *In vitro* plant propagation: A review. *Journal of florest science*. v. 27, n.2, p. 61-72, 2011.

- KUMAR, P. *et al.* Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, v.2, n 4, p.141-162, 2009.
- LANZA, L.L.B.; SOUZA, J.R.C.L.; OTTOBONI, L.M.M.; VIEIRA, L.M.C.; SOUZA, A.P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theoretical and genetics Journal*, v.94, p. 1023-1030, 1997.
- LEAL, R de S. *et al.* Perfil Etnobotânico e Atividade Antioxidante de *Cleome spinosa* (Brassicaceae) e *Pavonia varians* (Malvaceae). *Revista Fitos*, v. 3, n. 3, 2007.
- LEUNUFNA, S.; KELLER, E.R.J. Investigating a new cryopreservation protocol for yam (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Reports*, 21: 1159-1166, 2003.
- LI, D.Z.; PRITCHARD, H.W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in Plant Science*. v. 14. n. 11. p. 614-621, 2009.
- LI, J. W., *et al.* Cryopreservation and evaluations of vegetative growth, microtuber production and genetic stability in regenerants of purple-fleshed potato. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. v. 128, p. 641-653, 2017.
- LIU, Y.; WANG, X.; LIU, L. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. *Plant Science*, v.166, p.677-685, 2004.
- LOVELOCK, J.E.; BISHOP, M.W.H. Preservation of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature*. v. 183, p. 1394-1395, 1959.
- MANDAL, B.B.; AHUJA-GHOSH, S. Regeneration of *Dioscorea floribunda* plants from Cryopreserved encapsulated shoot tips: Effect of plant growth regulators. *CryoLetters*. v.28, n.5, p. 329-336, 2007.
- MARCO-MEDINA, A., *et al.* Cryopreservation of *Thymus moroderi* by droplet-vitrification. *Cryoletters*, v. 31, p. 14–23, 2010.
- MARCO-MEDINA, A.; CASAS, J.L.. RAPD and phytochemical analysis of *Thymus moroderi* plantlets after cryopreservation. *CryoLetters*, v. 34, n.2, p. 119-127, 2013.
- MARKOVIĆ, Z. *et al.* Duration of culture of grapevine (*Vitis vinifera*) microcuttings on medium with zeatin riboside affects shoot tip recovery after cryopreservation. Artigo apresentado em congresso, 2012.
- MARKOVIĆ, Z. *et al.* Effect of shooting medium and source of material on Grapevine (*Vitis vinifera* L.) shoot tip recovery after cryopreservation. *CryoLetters*, v. 35, n.1, p. 40-47, 2014.
- MARTÍN, C., *et al.* Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation–dehydration cryopreservation protocol. *Journal of Plant Physiology*. v. 168, p. 158-166, 2011.
- MARTÍN, C.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E. Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot apices after cryopreservation by vitrification and encapsulationdehydration. *Cryobiology*. v. 51, p.281-289, 2005.

MATSUMOTO, T. Cryopreservation of in vitro grown apical shoot tips of *Wasabia japonica* (Wasabi) by different procedures. In: TOWIL, L.E.; BAJAJ, Y.P.S. (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Berlim, p.180-195, 2002

MATSUMOTO, T. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. *Agricultural Science*. v. 5, p. 13-20, 2017.

MATSUMOTO, T. et al. Cryopreservation of blueberry dormant shoot tips using V cryoplate method. *The horticulture Journal*. v. 84, n. 2, p 106-110, 2015a

MATSUMOTO, T. et al. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters*. v. 16, p. 189-196, 1995.

MATSUMOTO, T. et al. Cryopreservation of persimmon shoot tips from dormant buds using the D cryo-plate technique. *The Horticulture Journal*.v. 84, p. 106–110, 2015b.

MATSUMOTO, T. et al. Development of *in vitro* propagation by node culture and cryopreservation by V-Cryo-plate method for *Perilla frutescens*. *Advances in Horticultural Science*, v. 28, n. 2, p. 79-83, 2014.

MATSUMOTO, T., et al. Cryopreservation of *Persimmon* shoot tips from dormant buds using the D cryoplate technique. *Horticulture Journals*. v. 84, p. 106–110, 2015.

MCNEIL, M.J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. *Natural Product Communications* v.5, n.8, p.1301-1306, 2010.

MCNEIL, M.J., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. *Natural Product Communications*, v.5, n. 8, p. 1301-1306, 2010.

MENON, A. et al. Cyopreservation of *Lomandra sonderi* (Asparagaceae) shoot tips using Droplet-Vitrification. *CryoLetters*, v. 33, n.4, p.259-270, 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). *Convenção sobre diversidade biológica*. (CDB), Brasília - DF, 2000. Acesso: Novembro de 2019. Disponível em: www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/_arquivos/cdbport.pdf.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Comunicação científica extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 23, n. 2, p. 447-450, 2001.

MONDINI, L; NOORANI, A; PAGNOTTA, M. A. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. *Diversity*, v. 1, p 19-35, 2009.

MORAES, B.A. Estabelecimento de culturas de raízes in vitro de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae) e avaliação da produção de metabólitos secundários. Dissertação de mestrado, UERJ, Rio de Janeiro, 2015.

- MOREIRA, M. A., et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- MUTHUKUMAR, M.; KUMAR, T. S.; RAO, M. V. Organogenesis and evaluation of genetic homogeneity through SCoT and ISSR markers in *Helicteres isora* L., a medicinally important tree. *South African Journal of Botany*, v. 106, p. 204–210, 2016.
- NADEEM, M. A., et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & biotechnological equipment*, v.32, n.2, p.261-285, 2018.
- NAIR, D. D., et al. Cryopreservation of Encapsulated Axillary Buds of *Clitoria ternatea* (L.). *Cryoletters*. v.40, n. 1, p. 28-35, 2019.
- NG, W.L.; TAN, S.G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? *ASM Science Journal*. v.9, n.1, p.30-39, 2015.
- NIAZIAN, M. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*. v. 249, n.4, p. 953-973, 2019.
- NIINO, T. et al. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* nakai) basal stem buds on cryo-plates. *Cryoletters*, v.34 (6), p.549-560, 2013.
- NIINO, T; WUNNA; WATANABE, K.; NOHARA, N.; RAFIQUE, T.; YAMAMOTO, S.; FUKUI, K.; ARIZAGA, M.V.; MARTINEZ, C.R.C.; MATSUMOTO, T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryo-plate. *Plant Biotechnology*. v. 31, p. 281-287, 2014.
- NISHIZAWA, S. et al. Cryopreservation of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by Vitrification method. *Plant science*, v.88, p.67-73, 1993.
- PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. v. 5, 2016.
- PANIS, B. Sixty years of plant cryopreservation: from freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. *Acta Horticulturae*. v. 1234, p 1-8, 2019.
- PANIS, B; PIETTE, B.; SWENNEN,R. Droplet Vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant science*, v.168, n.1, p.45-55, 2005.
- PAVIA, D. L., et al. Espectroscopia no ultravioleta. In: PAVIA, D. L (eds). Introdução à espectroscopia. *Cengage learning*. p. 365-398, 2012.

- PENCE, V.C. et al. *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation. Roma; IPGRI . IPGRI Technical Bulletin, n.7, 2002.
- PENNYCOOKE, J.C.; TOWILL, L.E. Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulationdehydration. *CryoLetters*. v. 22, p. 381-389, 2001.
- PEREIRA, D.A.; BRITO, A.C.; AMARAL, C.L.F. Biologia floral e mecanismos reprodutivos do mussambê (*Cleome spinosa* Jacq.) com vistas ao melhoramento genético. *Biotemas*, v.20, n.4, p 27-34. 2007.
- PICOLI, E.A.T. et al. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*, v.160, p.857-868, 2001.
- POLGE, C.S.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. v. 164, p. 666, 1949.
- Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*. v. 15, p. 7985-8005, 2010.
- PPETTINELLI, J.A., et al. Cryopreservation of somatic embryos from *Petiveria alliacea* L. by different techniques based on vitrification. *In vitro Cellular e Developmental Biology*. v. 53, p.339-345, 2017.
- QUIN, Y. et al. Propagation of *Cleome spinosa* Jacq through tissue culture. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v.1, n.5, p.1319-1327, 2012.
- RAFIQUE, T. et al. Cryopreservation of sugarcane using the V Cryo-plate technique. *CryoLetters*, v.36, n.1, p.51-59, 2015.
- RAFIQUE,T., et al. Cryopreservation of shoot-tips from different sugarcane varieties using D cryo-plate technique. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, v. 53, p. 151-158, 2016.
- RATHORE, N.S. et al. Genetic stability in micropropagated *Cleome gynandra* revealed by SCoT analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*. v. 36, n.2, p.555-559, 2014.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Sample Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. n.128, p.9-17, 2002.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento*. v.2, n.9, p.40-43, 2003.
- SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds). *Cryopreservation of tropical germplasm: Current research progress and applications*. Japan, p.1-7, 2000.
- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*, v.28, n.3, p.151-172, 2007.

- SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based Vitrification Protocols. In: REED, B. M. (Ed.) *Plant Cryopreservation - A Practical Guide*. New York, USA: Springer, p. 33-57, 2008.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, v.9, p.30-33, 1990.
- SALMA, M. et al. Comparison of droplet-vitrification and D-cryoplate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses. *Scientia Horticulturae*. v. 179, p. 91–97, 2014.
- SANAYAIMA, R.K. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Crateva nurvala* buch. ham, an important medicinal tree. *CryoLetters*, v. 27, n.6, p.375-386, 2006.
- SANTOS, D.A.; MENEZES, J.E.S.A. Estudo das atividades citotóxica e antimicrobiana de *Cleome spinosa* espécie nativa do município de Itapipoca. Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho, 2005.
- SEKIZAWA, K. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Biotechnology*, v.28, p.401-405, 2011.
- SELEEM, D., et al. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti- *Candida albicans* activity *in vitro*. *Archives of Oral Biology*. v.76, p. 76–83, 2017.
- SIMÃO, M.J., et al. Histological characterization of *Passiflora pohlii* Mast. root tips cryopreserved using the V-Cryo-plate technique. *Protoplasma*. v. 255, n. 3, p.741-750, 2017.
- SKYBA, M., et al. Physiological, biochemical and molecular characteristics of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. shoot tips. *Cryoletters*. v. 31, p. 249–260, 2010.
- SOLO'EVA, A L.; VYSOTSKAYA, O.N.; DOLGIKH, Y.I. Effect of dehydration duration of apices on characteristics of *in vitro* plants of *Fragaria vesca* after cryopreservation. v. 63, n. 2, p. 243-251, 2016.
- SUZUKI, M. et al. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. *Plant Biotechnology Reports*, v. 2, p. 123-131, 2008.
- SYTAR, O.; BRESTIC, M.; RAI, M.; SHAO, H. Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetic production. *Journal of Medicinal Plant Research*, v.6, n.13, p.2526-2539, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal In: *Fisiologia vegetal*. 4rd. ed. Artmed, p. 345-349, 2013.
- TANAKA, D., et al. Cryopreservation of Gemmae from the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant and Cell Physiology*, v. 57, p. 307-324, 2016.

- URAGAMI, A. et al. Survival of cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by Vitrification. *Plant Cell Reports*, v.8, p.418-421, 1989.
- UZEL, A., et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*. v. 160, n. 2, p. 189–195, 2005.
- VASCONCELOS, A.G.V. et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42, n.5, p. 837-844, 2012.
- VIANNA, M.G., et al. Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique: determination of the critical stages of the protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v. 139, n.2, p. 369-379, 2019.
- VIDAL, N. et al. Cryopreservation of chestnut by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v.41, p. 63-68, 2005.
- VILARDO, A.F.R.M. Criopreservação de plantas propagadas *in vitro* de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae). Dissertação de mestrado, UERJ, Rio de Janeiro, 2015.
- VILARDO, A.F.R.M., et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of the medicinal species *Cleome spinosa* (Cleomaceae) applying vitrification-based techniques. *CryoLetters*. v. 40, n. 4, p. 237-246, 2019.
- VOLK, G.M.; HARRIS, J.L.; ROTINDO, K.E. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology*, v. 52, p. 305-308, 2006.
- VOZNESENSKAYA, E.; KOTEYEVA, N.K.; CHUONG, S.D.X. Physiological, anatomical and biochemical characterization of the type of photosynthesis in *Cleome* species (Cleomaceae). *Functional Plant Biology*, v. 34 p.247–267, 2007.
- VUJOVIĆ, T. et al. Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. *Scientia Horticulturae*. v. 130, p 222–228, 2011.
- VUJOVIĆ, T., et al. Cryopreservation of *Prunus* spp. using aluminium cryo-plates. *Scientia Horticulturae*, v. 195, n. 12, p. 173–182, 2015.
- WANG, B., et al. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. *Biotechnology Advances*. v. 32, p. 583–595, 2014.
- WANG, Q. et al. A simple and efficient cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of Troyer'citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, v.128, n.1, p. 135-142, 2002.
- WANG, Q. et al. Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured *in vitro*. *CryoLetters*, v.24, p. 293-302, 2003.
- WANG, Q. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. *Plant Cell Reports*. v. 24, p. 280-288, 2005.

- WANG, R. et al. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. *Scientia Horticulturae*. v.176, p. 330–339, 2014.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*. v. 24, p. 438-450, 2001
- YAMAMOTO, S. et al. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. v. 10, p. 14-19, 2012b.
- YAMAMOTO, S. et al. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *Cryoletters*. v.32, n.3, p.256-265, 2011.
- YAMAMOTO, S. et al. Development of an effective cryopreservation protocol using aluminium cryo-plates for in vitro-grown shoot tips of mulberries (*Morus* spp.) originated from the tropics and subtropics. *Sanshi-Konchu Biotec*, v.81, p. 57-62, 2012c.
- YAMAMOTO, S. et al. The Aluminum Cryo-plate Increases Efficiency of Cryopreservation Protocols for Potato Shoot Tips, *American Journal of Potato Research*, 2015.
- YAMAMOTO, S. et al. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *Cryoletters*, v.33, n.1, p.12-23, 2012a.
- YAMAMOTO, S., et al. The aluminum cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips. *American Journal of Potato Research*, v. 92, p. 250–257, 2015.
- YUANYUAN, M.; YALI, Z.; JIANG, L.; HONGBO, S. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology*. v. 8, n. 10, p. 2004- 2010, 2009.
- ZHANG, Z., et al. Field performance evaluation and genetic integrity assessment in *Argyranthemum* ‘Yellow Empire’ plants recovered from cryopreserved shoot tips. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*.v. 51, p. 505-513, 2015.
- ZHU, G. et al. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. *Physiologia Plantarum*, v. 128, p. 80-94, 2006.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI A.; LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. v. 20, p. 176–183, 1994.

APÊNDICE - Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of the medicinal species *Cleome spinosa* (Cleomaceae) applying vitrification-based techniques

CryoLetters 40 (4), 237-246 (2019)

© CryoLetters, businessoffice@cryoletters.org

CRYOPRESERVATION OF *IN VITRO*-GROWN SHOOT TIPS OF THE MEDICINAL SPECIES *Cleome spinosa* (Cleomaceae) APPLYING VITRIFICATION-BASED TECHNIQUES

Anna Flávia Rodrigues Mortani Vilardo^{1*}, Thais Fortunato Mendonça¹, Florent Engelmann², Lívia Silva Cordeiro¹, Norma Albarello¹ and Claudia Simões-Gurgel¹

¹Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) - Núcleo de Biotecnologia Vegetal (NBV) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Rua São Francisco Xavier, 524, PHL, sala 509, Maracanã, CEP 20550-013 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 08 BP 841 Cotonou, Benin.

*Corresponding author email: anna.flavia.vilardo@gmail.com

Abstract

BACKGROUND: Few cryopreservation studies have been reported with the genus *Cleome*. Due to the use of *C. spinosa* in traditional medicine and its valuable pharmacological potential, the long-term conservation of the species will allow the safe maintenance of its germplasm. **OBJECTIVE:** This study compares two vitrification-based techniques on the cryopreservation of shoot tips of *C. spinosa*. **MATERIALS AND METHODS:** The effect of sucrose preculture and different vitrification solutions was evaluated using vitrification and V Cryo-plate techniques. The supplementation of recovery medium with BAP was also assessed. **RESULTS:** The V Cryo-plate proved to be the most efficient technique. Treatment of shoot tips with PVS2 at 0°C resulted in a higher regeneration response after cryopreservation when compared to treatment with PVS2 and PVS3 at 25°C. The highest survival (83.3%) and recovery (76.6%) were achieved for shoot tips exposed to PVS2 for 90 min at 0°C and recovered on MS medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ BAP for 2 weeks. **CONCLUSION:** Plants regenerated from cryopreserved shoot tips maintained their *in vitro* multiplication capacity and showed a normal phenotypic aspect, demonstrating the efficiency of the cryopreservation protocol.

Keywords: BAP, long-term conservation, PVS, shoot tips, vitrification, V Cryo-plate.

INTRODUCTION

Cleome spinosa Jacq. is a perennial herbaceous species belonging to the *Cleomaceae* family. It is frequently found in urban areas, which makes their populations vulnerable to anthropic impacts. The species presents ornamental value and is used in traditional medicine for the treatment of respiratory and inflammatory diseases (1, 9). Due to its ethnobotanical use, the species has been evaluated for pharmacological activities, such as

anti-inflammatory, antinociceptive (4) and antimicrobial (18, 29).

Considering the medicinal potential of the species, biotechnological studies have been carried out, resulting in the establishment of efficient protocols for micropropagation (3), callogenesis (2) and *in vitro* germination (8). However, the maintenance of *in vitro* materials is subject to contamination and risks of loss of genetic integrity, mainly due to the occurrence of somaclonal variation (35). Therefore, the establishment of a long-term conservation system to preserve this germplasm has been