



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

Tatiana Carvalho de Castro


**Produção de plantas e metabólitos de
Cleome dendroides Schult. & Schult. f. (Cleomaceae)
utilizando diferentes sistemas de cultivo *in vitro***

Rio de Janeiro

2015

Tatiana Carvalho de Castro

**Produção de plantas e metabólitos de
Cleome dendroides Schult. & Schult. f. (Cleomaceae)
utilizando diferentes sistemas de cultivo *in vitro***



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção de grau de doutor em Biologia Vegetal.

Orientação: Prof.^a Dra. Norma Albarello

Coorientação: Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

C355 Castro, Tatiana Carvalho de.
Produção de plantas e metabólitos de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) utilizando diferentes sistemas de cultivo *in vitro* / Tatiana Carvalho de Castro. - 2015.
202 f. : il.

Orientadora: Norma Albarello.

Coorientadora: Marsen Garcia Pinto Coelho.

Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

1. Plantas – Propagação-in-vitro – Teses. 2. Plantas – Cultivo – Teses. I. Albarello, Norma. II. Coelho, Marsen Garcia Pinto. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 631.589

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

Assinatura

Data

Tatiana Carvalho de Castro

**Produção de plantas e metabólitos de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f.
(Cleomaceae) utilizando diferentes sistemas de cultivo *in vitro***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção de grau de doutor em Biologia Vegetal.

Aprovada em 16 de julho de 2015.

Orientadoras:

Prof.^a Dra. Norma Albarello

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Aline Castellar Duarte

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Norma Albarello

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Luiz Henrique e a minha filha Thaís.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Norma Albarello, minha amiga, minha chefe e orientadora, por todo apoio em todas as áreas da minha vida, pela oportunidade que me deu nesta nova etapa da minha vida.

À Profa. Marsen Garcia Pinto Coelho, pela orientação tão importante na área de fitoquímica e pela amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da UERJ, seus coordenadores e funcionários, pelo apoio administrativo.

À Faperj, pelo apoio financeiro ao projeto “Produção e avaliação de plantas e metabólitos de interesse medicinal obtidos *in vivo* e *in vitro*”, onde a presente tese está inserida.

À amiga e colega Claudia Simões Gurgel, pela indicação da espécie, pela amizade, pela confiança, pelo auxílio em todas as etapas desta tese.

Aos meus colegas de trabalho, funcionários do IBRAG/UERJ, Victor Leonardo Bastos Pelliccione, Luciano Marques Alves, Iranilda Calado Santana, Eduardo Nunes, pelo auxílio técnico e pela amizade.

Aos meus colegas e amigos do Núcleo de Biotecnologia Vegetal – NBV, principalmente à Renata Garcia, sempre pronta a nos ajudar.

Aos bolsistas Maria Francisca Santoro (PROATEC), Adriana Lanzotti (QUALITEC), Gabriel Porto (QUALITEC), Cecília Azevedo de Souza (QUALITEC) pelo auxílio técnico e pela amizade.

Aos alunos de graduação e pós-graduação do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), Aline Saavedra, Florence Galvão, David Lucena, Lívia Cordeiro, Débora Lage, Graziela Mello, Thiago Barbosa, Ivan Ribeiro, Siomara Dias da Costa, Shade Vanicore, Matheus Tirado, Anna Flávia Villardo, Brenda Moraes, Daniele Maiato, Carlos Fernandes, Thiago Rebello, Thaís Fortunato, pelo ótimo convívio, pelos auxílios em experimentos e nas coletas e pela troca de informações de grande relevância.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica, Carlos Roberto Gayer, Leosvaldo Veloso e Daniele Corrêa Fernandes, pelo apoio na parte fitoquímica da tese.

À Profa. Cátia Callado e às colegas Jeanne Teixeira Gloria e Silvana Lacerda, pelo apoio nos experimentos de histoquímica.

À Profa. Mônica Regina da Costa Marques, pela colaboração na análise cromatográfica (CG - MS) realizada na Central Analítica Fernanda Coutinho do Instituto de Química da UERJ.

Ao Prof. Davyson de Lima Moreira, pela colaboração na análise cromatográfica (cromatografia líquida de alta eficiência) realizada no Departamento de Produtos Naturais de Farmanguinhos - FIOCRUZ.

Ao Prof. Antonio Jorge Ribeiro da Silva, do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors (IPPN-UFRJ), pela indicação da metodologia de extração dos glicosinolatos.

A meu marido Luiz Henrique Ferreira de Castro, pela paciência e pelo apoio, principalmente, nos dias mais atarefados. Pelo amor incondicional e pelo companheirismo nesses 23 anos de convivência. Obrigada por me fazer feliz.

A minha filha Thaís Carvalho de Castro, pelo amor mais puro que existe, pelas felicidades diárias que me dão mais força para viver, pela filha maravilhosa que é.

Aos meus pais Catia Magdalena e Sebastião Simas Pereira, pela confiança, pelo apoio contínuo a meus estudos, pelo carinho e amor.

A Deus, pelas graças a mim concedidas.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

CASTRO, T. C. **Produção de plantas e metabólitos de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) utilizando diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.** 2015. 202f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Cleome dendroides é uma espécie endêmica da Mata Atlântica dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, bioma alterado por intensa atividade antrópica, o que constitui uma ameaça à preservação de suas populações. Não existem estudos dos pontos de vista fisiológico, biotecnológico, fitoquímico ou farmacológico sobre a espécie. Considerando-se o perfil fitoquímico e o potencial medicinal do gênero, torna-se relevante definir-se protocolos para a produção de plantas e metabólitos de *C. dendroides* utilizando diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. No presente trabalho, foram realizados estudos sobre a germinação *in vivo* da espécie, avaliando-se a influência do substrato, temperatura e luz. Não se observou qualquer tipo de dormência, sendo as temperaturas de 20, 25 e 20-30°C, em areia ou vermiculita, apropriadas para a germinação *in vivo*. Definiu-se também uma metodologia eficiente de germinação sob condições *in vitro*, e as plântulas obtidas foram utilizadas como fonte de explantes para os estudos de propagação *in vitro*. A resposta morfogênica foi avaliada considerando-se a origem e tipo do explante, tipos e concentrações de reguladores de crescimento e número de subculturas. A metodologia empregada mostrou-se eficiente para a produção de brotos e manutenção de estoques de plantas *in vitro* que serviram como fonte de explantes. A melhor condição para a propagação *in vitro* foi definida em meio solidificado contendo BA, independentemente do tipo de explante e da origem. Os brotos obtidos foram alongados, enraizados e aclimatizados. Também foi estabelecida a cultura de raízes e a regeneração de brotos a partir destas culturas. Avaliou-se o efeito da origem do explante, assim como dos tipos e concentrações de fitorreguladores sobre a proliferação de raízes e a regeneração de brotos. O fitorregulador AIB propiciou maior multiplicação das raízes, enquanto BA mostrou-se eficiente na regeneração de brotos a partir das raízes recém-formadas. Foi estabelecido ainda um protocolo de cultura de calos e de suspensões celulares. Avaliou-se o efeito da origem e do tipo de explante, dos tipos e das concentrações de fitorreguladores sobre a calogênese. A combinação de PIC com KIN foi a mais eficiente para a indução de calos em explantes de plântulas obtidas a partir de germinação *in vitro*, produzindo calos que foram mantidos por pelo menos dois anos. As suspensões celulares também foram estabelecidas em meio contendo PIC + KIN, mantendo uma produção de biomassa de cerca de cinco vezes o peso fresco inicial por três sucessivas subculturas. Análises histoquímicas e fitoquímicas revelaram a presença de alcaloides nos calos e nas suspensões celulares. Foram realizadas análises fitoquímicas de plantas de campo, plantas aclimatizadas, plantas mantidas em estoque *in vitro* e culturas de raízes, as quais indicaram a presença de derivados de glicosinolatos. Os resultados demonstraram a viabilidade de produção de material vegetal de *C. dendroides* por meio de métodos biotecnológicos e a produção *in vitro* de metabólitos de importância medicinal.

Palavras-chave: Cultivo vegetal *in vitro*. Germinação. Estratégias biotecnológicas. Análises cromatográficas. Glicosinolatos. Alcaloides.

ABSTRACT

CASTRO, T. C. **Plants and metabolites production of *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) using different *in vitro* culture systems.** 2015. 202f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Cleome dendroides is an endemic species of the Atlantic Forest of Rio de Janeiro and Espírito Santo states, biome changed by intense human activities that threaten its populations. There are no physiological, biotechnological, phytochemical or pharmacological studies of this specie. Considering the phytochemical profile and the medical potential of the genus, it becomes relevant to establish protocols for the production of plants and metabolites of *C. dendroides* using different *in vitro* culture systems. In this work, studies were performed on the *in vivo* germination of the species evaluating the influence of the substrate, temperature and light. There was no dormancy, and germination was achieved at 20, 25 and 20-30°C, on sand or vermiculite substrates. An efficient methodology of germination under *in vitro* conditions was defined by comparing the different stages of post-seminal development with seedlings from germination under *in vivo* conditions. The plantlets obtained from the *in vitro* germination were used as a source of explants for *in vitro* propagation system. The morphogenic response was evaluated considering the source and type of explant, types and concentrations of growth regulators and number of subcultures. The methodology was efficient for the production of shoots and maintenance of *in vitro* plants. The best condition for *in vitro* propagation was using solidified medium supplemented with BA, regardless of the tested explants. The shoots were efficiently elongated, rooted and acclimatized. It was also established an efficient protocol for root culture and shoots regeneration from these cultures. The effect of source of explant, the types and growth regulator concentrations on the proliferation of roots and shoot regeneration was evaluated. IBA provided higher multiplication rates of the roots, whereas BA was effective in the regeneration of shoots from the newly formed roots. A protocol of callus culture and cell suspension culture was established. The effect of the origin and type of explant, the types and concentrations of growth regulators on callus formation was evaluated. PIC + KIN was the most efficient combination for callus induction from explants derived from *in vitro* germinated seedlings. Callus cultures were maintained for at least two years. Cell suspension cultures were established with the same combination of growth regulators (PIC + KIN), maintaining a biomass of about five times the initial fresh weight of three successive subcultures. Histochemical and phytochemical analysis revealed the presence of alkaloids in callus and suspension cell cultures. Phytochemical analyses of field plants, acclimatization *in vitro* plant and culture roots were performed, which indicated the presence of glucosinolate derivatives. The results demonstrated the possibility of producing medicinal important metabolites from *C. dendroides* by biotechnological methods.

Keywords: *In vitro* plant culture. Germination. Biotechnological strategies. Chromatographic analysis. Glucosinolates. Alkaloids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química básica dos glicosinolatos.....	29
Quadro 1 -	Metabólitos secundários produzidos por diferentes técnicas de cultura de tecidos vegetais.....	35
Figura 2 -	Exemplar de <i>Cleome dendroides</i> (<i>Cleomaceae</i>), localizado no Morro da Urca, Rio de Janeiro, RJ.....	40
Figura 3 -	Aparelho de destilação e extração simultânea.....	55
Figura 4 -	Regeneração <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> , a partir de explantes hipocotiledonares de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura em meio básico MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.....	60
Figura 5 -	Proliferação <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> , a partir de brotos produzidos em explantes hipocotiledonares de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 60 dias em cultura em meio básico MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.....	61
Figura 6 -	Regeneração <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes de lâmina foliar de plântulas obtidas de germinação <i>in vitro</i> , após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.....	64
Figura 7 -	Regeneração <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes de raiz de plântulas obtidas de germinação <i>in vitro</i> , após 60 dias em cultura, em meio básico MS suplementado com BA.....	66
Figura 8 -	Estoque de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> em meio de cultura MS isento de reguladores de crescimento, após um ano de cultura.....	67
Figura 9 -	Desenvolvimento das gemas axilares e regeneração de gemas adventícias a partir de explante caulinar oriundo de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura, em meio básico MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.....	68

Figura 10 - Proliferação <i>in vitro</i> , por organogênese direta, a partir brotos produzidos em explantes caulinares de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com BA.....	69
Figura 11 - Regeneração de brotos, a partir de explantes de lâmina foliar, de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura, em meio MS suplementado com 1 mg.L ⁻¹ BA.....	72
Figura 12 - Regeneração de brotos a partir de explantes de lâmina foliar de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.....	73
Figura 13 - Regeneração de brotos a partir de explantes de raiz de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com BA.....	75
Figura 14 - Brotos alongados e enraizados de <i>Cleome dendroides</i> , após 45 dias, em meio MS0.....	76
Figura 15 - Plantas de <i>Cleome dendroides</i> produzidas <i>in vitro</i> em fase de aclimatização após duas semanas da transferência para substrato Plantmax®.....	77
Figura 16 - Plantas de <i>Cleome dendroides</i> aclimatizadas após oito semanas da transferência para substrato.....	78
Figura 17 - Cromatografia em camada delgada de extrato de sementes de <i>Cleome dendroides</i> produzido por partição com diclorometano.....	79
Figura 18 - Cromatogramas obtidos por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos de planta de campo de <i>Cleome dendroides</i>	81
Figura 19 - Cromatogramas obtidos por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos de material vegetal <i>in vitro</i> e planta aclimatizada de <i>Cleome dendroides</i>	82
Figura 20 - Espectro de massas da substância com tempo de retenção 32,382 min obtido em análise por CG-EM de extrato de cultura de raízes de plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i>	84

Figura 21 -	Espectro de massas da substância com tempo de retenção 36,804 min obtido em análise por CG-EM de extrato de semente de <i>Cleome dendroides</i>	84
Figura 22 -	Multiplicação <i>in vitro</i> de raízes de <i>Cleome dendroides</i> a partir de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , com uma semana de cultivo, em meio de cultura MS na composição salínica total, isento de reguladores de crescimento.....	103
Figura 23 -	Multiplicação <i>in vitro</i> de raízes de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes radiculares de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , com quatro semanas de cultivo, em meio MS isento de reguladores de crescimento, em diferentes composições salínicas.....	104
Figura 24 -	Calogênese em explantes radiculares de <i>Cleome dendroides</i> provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , cultivados em meio MS com ANA, após quatro semanas de cultivo.....	107
Figura 25 -	Ausência de resposta morfogênica em explantes radiculares de <i>Cleome dendroides</i> provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , após quatro semanas, em meio suplementado com PIC ou 2,4-D.....	107
Figura 26 -	Multiplicação <i>in vitro</i> de raízes de <i>Cleome dendroides</i> provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , com quatro semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com AIA.....	108
Figura 27 -	Multiplicação <i>in vitro</i> de raízes de <i>Cleome dendroides</i> provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , com quatro semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com AIB.....	108
Figura 28 -	Multiplicação <i>in vitro</i> de raízes de <i>Cleome dendroides</i> , provenientes de plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i> , com quatro semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com AIB.....	111

Figura 29 -	Regeneração de brotos <i>in vitro</i> a partir de raízes recém-formadas de <i>Cleome dendroides</i> , em meio de cultura MS suplementado com 1,0 mg.L ⁻¹ BA.....	112
Figura 30 -	Acúmulo de biomassa em cultura de raízes de <i>Cleome dendroides</i> provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , em meio de cultura MS suplementado com 3,0 mg.L ⁻¹ AIB, ao longo de quatro subculturas.....	114
Figura 31 -	Multiplicação <i>in vitro</i> de raízes de <i>Cleome dendroides</i> provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , após 30 dias de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com 3 mg.L ⁻¹ AIB e elicitores.....	117
Figura 32 -	Cromatogramas obtidos por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos de culturas <i>in vitro</i> de raízes de <i>Cleome dendroides</i> adicionadas de elicitores.....	120
Figura 33 -	Cromatogramas obtidos por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos de culturas <i>in vitro</i> de raízes de <i>Cleome dendroides</i> adicionadas de aminoácidos precursores de glicosinolatos (200 mg.L ⁻¹).....	121
Figura 34 -	Diferentes respostas morfogênicas em explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares de <i>Cleome dendroides</i> provenientes de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 15 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes auxinas isoladas (ANA, 2,4-D, PIC) ou em combinação com KIN.....	143
Figura 35 -	Cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com PIC isolado ou em combinação com KIN.....	146
Figura 36 -	Cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D isolado ou em combinação com KIN.....	146

Figura 37 -	Cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com AIA isolado ou em combinação com KIN.....	147
Figura 38 -	Cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com ANA isolado ou em combinação com KIN.....	147
Figura 39 -	Cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares oriundos de plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i> , após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com PIC isolado ou em combinação com KIN.....	151
Figura 40 -	Cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares oriundos de plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i> , após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D isolado ou em combinação com KIN.....	151
Figura 41 -	Cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares oriundos de plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i> , após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com AIA isolado ou em combinação com KIN.....	152
Figura 42 -	Cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares oriundos de plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i> , após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com ANA isolado ou em combinação com KIN.....	152
Figura 43 -	Manutenção da cultura de calos de <i>Cleome dendroides</i> em meio MS + 1 mg.L ⁻¹ PIC + 0,1 mg.L ⁻¹ KIN.....	154
Figura 44 -	Cultura de células em suspensão de <i>Cleome dendroides</i> em meio com 1 mg.L ⁻¹ PIC + 0,1 mg.L ⁻¹ KIN, após 19 dias de inoculação de 2 g de calo friável.....	155
Figura 45 -	Curva de crescimento da cultura de células em suspensão de <i>Cleome dendroides</i> , em meio MS suplementado com 1 mg.L ⁻¹ PIC + 0,1 mg.L ⁻¹ KIN.....	157

Figura 46 - Cultura de células em suspensão de <i>Cleome dendroides</i> , em meio MS suplementado com 1 mg.L ⁻¹ PIC + 0,1 mg.L ⁻¹ KIN, após 15 dias de cultivo.....	158
Figura 47 - Análise histoquímica de calos e cultura de células em suspensão de <i>Cleome dendroides</i> , em meio MS com 1 mg.L ⁻¹ PIC + 0,1 mg.L ⁻¹ KIN, após 30 e 19 dias em cultura, respectivamente.....	159
Figura 48 - Análise espectrofotométrica de extrato de calo de <i>Cleome dendroides</i>	160
Figura 49 - Análise cromatográfica por CLAE de extrato de calo de <i>Cleome dendroides</i>	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração dos reguladores de crescimento suplementados ao meio MS nos experimentos de organogênese de <i>Cleome dendroides</i>	52
Tabela 2 -	Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos de <i>Cleome dendroides</i> , a partir de explantes de hipocótilo de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.....	60
Tabela 3 -	Frequência de proliferação, número médio e tamanho médio de brotos de <i>Cleome dendroides</i> , a partir de brotos produzidos em explantes hipocotiledonares de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , durante três subculturas mensais, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.....	62
Tabela 4 -	Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos de <i>Cleome dendroides</i> , a partir de explantes de lâmina foliar de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , durante 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.....	64
Tabela 5 -	Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos de <i>Cleome dendroides</i> , a partir de explantes de raiz de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA..	65
Tabela 6 -	Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos de <i>Cleome dendroides</i> , a partir de explantes de caule de plantas mantidas <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.....	68
Tabela 7 -	Frequência de proliferação, número médio e tamanho médio de brotos de <i>Cleome dendroides</i> , a partir brotos produzidos em explantes de caule de plantas mantidas <i>in vitro</i> , durante três	

	subculturas mensais, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.....	70
Tabela 8 -	Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos, a partir de explantes de lâmina foliar de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , durante 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.....	72
Tabela 9 -	Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos, a partir de explantes de raiz de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , durante 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.....	74
Tabela 10 -	Efeito de diferentes pré-tratamentos no alongamento e enraizamento de brotos de <i>Cleome dendroides</i>	76
Tabela 11 -	Efeito de diferentes pré-tratamentos no alongamento e sobrevivência de plantas de <i>Cleome dendroides</i> , após oito semanas de transferência para substrato.....	78
Tabela 12 -	Rendimento (%) da extração por partição com diclorometano dos diferentes materiais vegetais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i>	80
Tabela 13 -	Tempo de retenção e concentração em porcentagem de derivados de glicosinolatos presentes nos diferentes materiais vegetais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i>	83
Tabela 14 -	Efeito de diferentes concentrações da composição salínica do meio básico MS, sem fitorreguladores, sobre o crescimento de raízes de <i>Cleome dendroides</i> cultivadas <i>in vitro</i> , a partir de explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura.....	104
Tabela 15 -	Efeito de diferentes auxinas sobre o crescimento de raízes de <i>Cleome dendroides</i> cultivadas <i>in vitro</i> , a partir de explantes radiculares de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura.....	105
Tabela 16 -	Efeito de diferentes concentrações da composição salínica do meio básico MS suplementado com 3 mg.L ⁻¹ AIB sobre o crescimento de	

	raízes <i>in vitro</i> de <i>Cleome dendroides</i> , a partir de explantes radiculares de plântulas oriundas de germinação sob condições <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura.....	108
Tabela 17 -	Efeito de diferentes concentrações da composição salínica do meio básico MS, sem fitorreguladores, sobre o crescimento de raízes de <i>Cleome dendroides</i> cultivadas <i>in vitro</i> a partir de explantes radiculares provenientes de plantas mantidas <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura.....	109
Tabela 18 -	Efeito de diferentes auxinas sobre o crescimento de raízes de <i>Cleome dendroides</i> cultivadas <i>in vitro</i> a partir de explantes radiculares provenientes de plantas mantidas <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura.....	110
Tabela 19 -	Regeneração de brotos de <i>Cleome dendroides</i> a partir de explantes radiculares recém-formados em culturas provenientes de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 60 dias de cultivo...	113
Tabela 20 -	Regeneração de brotos <i>in vitro</i> a partir de raízes recém-formadas de <i>Cleome dendroides</i> , em meio de cultura MS suplementado com 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L ⁻¹ BA, ao longo de quatro subculturas.....	115
Tabela 21 -	Efeito de diferentes elicitores sobre o crescimento de raízes de <i>Cleome dendroides</i> cultivadas <i>in vitro</i> a partir de explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura.....	116
Tabela 22 -	Efeito de diferentes precursores (200 mg.L ⁻¹) sobre o crescimento de raízes de <i>Cleome dendroides</i> cultivadas <i>in vitro</i> , a partir de explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 30 dias em cultura.....	118
Tabela 23 -	Rendimento (%) da extração por partição com diclorometano das culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i>	119
Tabela 24 -	Tempo de retenção e concentração em porcentagem do derivado de glicosinolato presente nas culturas de raízes de <i>Cleome dendroides</i>	122

Tabela 25 -	Diferentes respostas morfogênicas em explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares de plântulas de <i>Cleome dendroides</i> oriundas de germinação <i>in vitro</i> , em meio MS suplementado com as auxinas PIC, 2,4-D, AIA, ANA, isoladas ou em combinação com KIN, após 45 dias em cultura.....	145
Tabela 26 -	Influência das auxinas PIC e 2,4-D, isoladas ou em combinação com KIN, sobre a produção de massa calogênica a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares de plântulas de <i>Cleome dendroides</i> oriundas de germinação <i>in vitro</i> , após 45 dias em cultura.....	148
Tabela 27 -	Diferentes respostas morfogênicas em explantes foliares, caulinares e radiculares de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , em meio MS suplementado com as auxinas PIC, 2,4-D, AIA, ANA, isoladas ou em combinação com KIN, após 45 dias em cultura.....	150
Tabela 28 -	Influência das auxinas PIC e 2,4-D, isoladas ou em combinação com KIN, sobre a produção de massa calogênica a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares de plantas de <i>Cleome dendroides</i> mantidas <i>in vitro</i> , após 45 dias em cultura.....	153
Tabela 29 -	Avaliação do tamanho do inóculo para o estabelecimento da cultura de células em suspensão de <i>Cleome dendroides</i> , após 19 dias em meio líquido MS + 1 mg.L ⁻¹ PIC + 0,1 mg.L ⁻¹ KIN.....	155
Tabela 30 -	Manutenção das culturas de células em suspensão de <i>Cleome dendroides</i> durante três subculturas.....	158
Tabela 31 -	Rendimento da extração ácido-básica realizada em amostras de calos de <i>Cleome.dendroides</i>	160

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido indolilbutírico
ANA	Ácido 1-naftalenoacético
ATP	Adenosina trifosfato
BA	6-benzilaminopurina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cultura de células em suspensão
CG/EM	Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE/RMN	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear
CLAE/UV/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrofotometria de ultravioleta e à espectrometria de massas
EM	Espectrometria de Massas
Fr	Frequência relativa de germinação
FR	Frequência regenerativa (%)
G	Porcentagem de germinação
HPLC	High performance liquid chromatography
KIN	Cinetina (6- furfurilaminopurina)
mod.	modelo
MS	Meio de cultura de Murashige e Skoog
MS0	Meio de cultura de Murashige e Skoog isento de reguladores de crescimento com a composição salínica total
MS $\frac{1}{4}$	Meio de cultura de Murashige e Skoog isento de reguladores de crescimento com $\frac{1}{4}$ da composição salínica
MS $\frac{1}{2}$	Meio de cultura de Murashige e Skoog isento de reguladores de crescimento com $\frac{1}{2}$ da composição salínica
<i>m/z</i>	razão massa/carga
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio

NMB	Número médio de brotos por explante
P.A.	Padrão analítico
PF	Peso de matéria fresca
pH	Potencial hidrogeniônico
PIC	Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico)
PS	Peso de matéria seca
RAS	Regras de Análise de Sementes
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
S-GT	enzima tiohidroximato glicosiltransferase
ST	enzima desulfoglicosinolato sulfotransferase
TMB	Tamanho médio dos brotos (cm)
TMG	Tempo médio de germinação (dias)
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
U	Grau de umidade
UV	Ultravioleta
VG	Velocidade de germinação
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
% p/v	Porcentagem peso por volume
$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Unidade de intensidade luminosa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	23
1	REVISÃO DA LITERATURA	23
1.1	Cleome dendroides Schult. & Schult. f.	23
1.2	O Gênero <i>Cleome</i> L.	24
1.3	Uso tradicional, aspectos farmacológicos e fitoquímicos	25
1.4	Glicosinolatos	29
1.5	Cultura de tecidos vegetais	31
1.6	Cultura de tecidos vegetais como fonte de substâncias bioativas	33
2	OBJETIVOS	36
3	Caracterização do processo germinativo de <i>Cleome dendroides</i> Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) sob condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	37
3.1	Introdução	37
3.2	Objetivos	39
3.3	Material e Métodos	40
3.4	Resultados	45
4	Micropropagação de <i>Cleome dendroides</i> Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) e produção de glicosinolatos com análise comparativa <i>in situ</i> e <i>in vitro</i>	46
4.1	Introdução	46
4.2	Objetivos	50
4.3	Material e Métodos	51
4.4	Resultados	59
4.5	Discussão	86
4.6	Conclusões	93
5	Avaliação do potencial morfogênico de cultura de raízes de <i>Cleome dendroides</i> Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) e produção de glicosinolatos	94
5.1	Introdução	94
5.2	Objetivos	97
5.3	Material e Métodos	98

5.4	Resultados	103
5.5	Discussão	123
5.6	Conclusões	130
6	Estabelecimento de cultura de calos e de células em suspensão visando a análises fitoquímicas de <i>Cleome dendroides</i> Schult. & Schult. f	131
6.1	Introdução	131
6.2	Objetivos	134
6.3	Material e Métodos	135
6.4	Resultados	142
6.5	Discussão	162
6.6	Conclusões	169
	CONCLUSÕES FINAIS	170
	PERSPECTIVAS	171
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
	ANEXO - Reagente de Groots	191
	APÊNDICE - Artigo publicado no periódico Journal of Seed Science	193

INTRODUÇÃO

Cleome dendroides é uma espécie endêmica da Mata Atlântica dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, bioma alterado por intensa atividade antrópica, o que constitui uma ameaça à preservação de suas populações. Não existem estudos dos pontos de vista fisiológico, biotecnológico, fitoquímico ou farmacológico sobre a espécie. A Mata Atlântica, bioma no qual a espécie em estudo está inserida, encontra-se entre os 25 *hotspots* mais importantes do mundo, ou seja, entre as regiões mais ricas e ameaçadas do planeta. Sua área, que antes abrangia o equivalente a 1.315.460 Km² e ocupava 15% do território brasileiro, em 17 estados (ISA, 2001), atualmente apresenta menos de 100.000 km² remanescentes, o que corresponde a menos de 8% do que existia originalmente (CARNAVAL et al., 2009).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f.

Cleome dendroides é uma espécie endêmica do Brasil, de distribuição geográfica restrita à região Sudeste, mais especificamente aos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (MARQUES, 2015). Ocorre em regiões de Mata Atlântica, geralmente próximas ao mar, em ambientes abertos ou devastados, com solos pedregosos e altitudes que variam do nível do mar até 1400 m. Existem apenas alguns registros de sua ocorrência em áreas de preservação, como no Parque Estadual da Serra da Tiririca (Niterói), Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Teresópolis e Petrópolis), Nova Friburgo, Monumento Natural do Arquipélago das Ilhas Cagarras (Praia de Ipanema), Parque Estadual de Paraty-Mirim, Morro da Urca (Área Protegida - Tombamento Federal/73 e decreto municipal 02/06/2006) e Parque Nacional dos Pontões Capixabas (Espírito Santo). Registros em áreas urbanas datam de 1916, 1935 e 1957, nos bairros da Gávea, Recreio dos Bandeirantes e Grajaú, respectivamente (ANDREATA et al., 2008; BOVINI, et al., 2014; COSTA-E-SILVA, 2000).

Cleome dendroides tem como sinônimo heterotípico *Cleome dodecaphylla* Vell. (MARQUES, 2015). É perene, anual ou bianual, raramente perdura mais que quatro ou cinco anos (HOOKER, 1834). Possui hábito arbustivo, caule ereto, ramos

simples, chegando a atingir dois metros de altura. Suas folhas compostas possuem de cinco a onze folíolos, geralmente sete, pilosos em ambas as faces, de formato elíptico, base atenuada, ápice acuminado e margem ciliada. Seus pecíolos apresentam, por vezes, acúleos. Suas inflorescências, em corimbo, são vistosas, de tonalidade roxa intensa, o que permitiria seu uso para fins paisagísticos (COSTA-E-SILVA, 2000; HOOKER, 1834).

Apesar de várias espécies do gênero *Cleome* serem objeto de pesquisas, não existem estudos dos pontos de vista fisiológico, biotecnológico, fitoquímico ou farmacológico sobre *C. dendroides*.

1.2 O Gênero *Cleome* L.

O gênero *Cleome*, anteriormente incluído na família Capparaceae, foi recentemente reclassificado na família Cleomaceae Bercht. & J.Presl. Estudos moleculares permitiram o reconhecimento de três famílias monofiléticas: Capparaceae, Brassicaceae e Cleomaceae (ILTIS et al., 2011). A família Cleomaceae encerra oito gêneros, entre os quais *Cleome* é o mais representativo, contendo de 180 a 200 espécies distribuídas por regiões tropicais e subtropicais da África, América, Ásia e Austrália (CRONQUIST, 1981; ILTIS et al., 2011; SANCHEZ-ACEBO, 2005). Segundo Iltis e Zapata (1998), 83 espécies ocorrem nas Américas. No Brasil, encontram-se 21 espécies e duas subespécies distribuídas de norte a sul do país, em todos os biomas (MACIEL et al., 2013).

As espécies do gênero são principalmente ervas e subarbustos e, menos frequentemente, arbustos, conhecidas popularmente como mussambê (COSTA-E-SILVA, 2000). Outra denominação é flor-de-aranha, relacionada aos longos estames e/ou vagens, presumivelmente, semelhantes às longas patas de algumas espécies de aranhas (NOZZOLILLO et al., 2010). Devido às vistosas inflorescências terminais ou axilares, geralmente do tipo corimbo, de coloração que varia do branco ao violáceo, passando por amarelo e por vários tons de rosa, algumas espécies possuem potencial ornamental (ALBARELLO et al., 2006; NOZZOLILLO et al., 2010; SIMÕES et al., 2010).

Muitas espécies do gênero foram investigadas sob o ponto de vista fitoquímico e farmacológico, indicando um grande potencial para exploração medicinal. Várias espécies mostraram-se produtoras de metabólitos com importância

medicinal (BALA, et al., 2010; MCNEIL et al., 2010; MONTHANA et al., 2006; NARENDHIRAKANNAN et al., 2007; PARIMALAKRISHNAN et al., 2009; SIMÕES et al., 2006; 2010; SONGSAK; LOCKWOOD, 2004). Porém, dentre as espécies existentes no Brasil, poucas têm sido objeto de estudos.

1.3 Uso tradicional, aspectos farmacológicos e fitoquímicos

O gênero *Cleome* é conhecido popularmente por suas diversas propriedades medicinais (APARADH et al., 2012).

Cleome droserifolia é amplamente utilizada na medicina tradicional do Egito como um agente hipoglicêmico (EL-ASKARY, 2005). A infusão de folhas de *C. africana* é também empregada naquele país em casos de dores abdominais e em inflamações (NAGAYA et al., 1997; TSICHRITZIS et al., 1993). Para *C. amblyocarpa* também foi reportado efeito analgésico para dores abdominais e reumáticas (ELGAMAL et al., 1992; SHARAF et al., 1997).

Cleome chelidonii é conhecida por possuir múltiplas propriedades terapêuticas. É usada em tratamentos de cólicas, desenterias, otite, reumatismo, doenças de pele e como vermífugo (PARIMALAKRISHNAN et al., 2009).

Cleome brachycarpa, adotada na medicina tradicional do Sudão, é utilizada em tratamentos de escabiose, reumatismo, inflamação e amigdalite (AHMAD et al., 1986; ALMAGBOUL et al., 1985; HARRAZ et al., 1995). Outra espécie tradicional do Sudão é *C. viscosa* cujos caules são empregados em fermentos (ALMAGBOUL et al., 1985). Na Índia, sementes de *C. viscosa* têm amplo uso para febre, inflamações, convulsões infantis, doenças do fígado, bronquite, diarreia e doenças articulares crônicas. Suas sementes são usadas como anti-helmíntico, enquanto que as folhas são úteis na cicatrização de feridas (PARIMALADEVI et al., 2003a; RAY; CHATTOPADHYAY, 1980). Ainda na medicina tradicional da Índia, folhas, raízes e sementes de *C. rutidosperma* são usadas como estimulante, antiescorbútico, anti-helmíntico, rubefascente e carminativo (BOSE et al., 2007).

Outra espécie de *Cleome* tradicionalmente conhecida por suas diversas propriedades medicinais é *C. gynandra* cujas folhas têm efeito sobre dor de ouvido, doenças de pele e febre malárica (APARADH et al., 2012), sendo também usadas em fermentos e dores de cabeça (BALA et al., 2010). Suas sementes têm sido

utilizadas como agente anti-helmíntico (AJAIYEOBA, 2000) e o decocto de suas raízes possui ação antipirética (BALA et al., 2010). Os caules são usados como analgésico e anti-inflamatório (GUPTA; CHAKRAVARTY, 1957). A espécie também é empregada no tratamento de úlcera péptica, de dor de dente, de hemorragias (DAS et al., 1999; HEBBAR et al., 2004), de hemorróidas, de reumatismo e de tumores (MULE et al., 2008).

Algumas espécies de *Cleome* são empregadas na medicina popular do Brasil. Na região amazônica, *C. latifolia* é usada como analgésico e antitérmico, na forma de infusão (DI STASI et al., 1994). Na região Nordeste, também na forma de infusão, *C. aculeata* é utilizada contra doenças renais e obesidade (AGRA et al., 2007). Na mesma região, *C. spinosa* é utilizada com diversas finalidades. As folhas e raízes são empregadas contra asma, tosse, bronquite e como rubefascente, suas flores, contra febre (AGRA et al., 2007), e a planta inteira, como digestiva e cicatrizante (CABRAL E AGRA, 1998).

O gênero *Cleome* tem sido investigado quanto ao seu potencial medicinal, sendo comprovadas diferentes propriedades (APARADH et al., 2012), sendo *C. gynandra* mais pesquisada em relação a esse aspecto. Extratos etanólicos de folha administrados via oral em ratos demonstraram atividades antioxidante (NARENDHIRAKANNAN et al., 2005) e anti-inflamatória (NARENDHIRAKANNAN et al., 2007). Extratos metanólicos e suas frações, administrados intraperitonealmente, mostraram potente atividade anticancerígena contra tumor ascítico de Ehrlich (BALA et al., 2010; 2011).

Cleome viscosa também tem sido objeto de estudos farmacológicos. Extratos de partes aéreas demonstraram potencial antioxidante (NIRAIMATHI et al., 2012), enquanto folhas apresentaram atividades antinociceptiva (BOSE et al., 2011) e hepatoprotetora (GUPTA; DIXIT, 2009). Atividades anti-helmíntica, analgésica e antiemética foram demonstradas em extratos de planta inteira (PILLAI; NAIR, 2011) e sementes (AHMED et al., 2011).

Cleome gynandropsis e *C. viscosa* apresentaram atividade antibacteriana contra *Alkaligenes viscolactis*, *Aeromonas hydrophilla*, *Klebsiella aerogenas*, *Bacillus cerues* e *Streptococcus pyogens* (PERUJMAL SAMY et al., 1999). Extratos metanólicos de *C. viscosa* mostraram atividades analgésica (PARIMALADEVI et al., 2003a) e antipirética (PARIMALADEVI et al., 2003b), enquanto que em extratos

hexânicos foram verificadas atividades inseticida, nematocida, antifúngica e antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Cladosporium cucumerinum* (WILLIAMS et al., 2003). Também foi observada atividade antimicrobiana em extratos metanólico e aquoso de parte aérea (SARADHA; RAO, 2010), em extrato etanólico (SUDHAKAR et al., 2006) e metanólico (BOSE et al., 2011) de folha e em extrato clorofórmico e acetônico de sementes (UPADHYAY et al., 2008). Atividade antimicrobiana foi também verificada em extrato etanólico de sementes de *C. chrysantha* (HASHIM; WAHBA, 2000) e em extratos clorofórmico, metanólico e aquoso de caule de *C. brachycarpa* (ALMAGBOUL et al., 1985).

Em *C. aculeata* foi detectada atividade citotóxica contra células de carcinoma epidermoide humano (KB) (NASCIMENTO et al., 1990), enquanto que *C. africana* exibiu atividade citotóxica contra células leucêmicas de rato (NAGAYA et al., 1997).

Extrato etanólico de parte aérea de *C. rutidosperma* apresentou atividade analgésica, anti-inflamatória e antipirética, tendo o fracionamento do extrato potencializado os resultados (BOSE et al., 2007).

Extrato hidrometanólico de parte aérea de *C. arabica*, bem como o derivado de esteroide isolado apresentaram capacidade antioxidante *in vitro* (DJERIDANE et al., 2010). Extratos de folhas da espécie mostraram resultado positivo quanto à ação anti-inflamatória (BOURICHE et al., 2005) e quanto à atividade anticancer em cinco linhagens tumorais humanas (adenocarcinoma da mama, carcinoma do cólon, neuroblastoma, hepatoma, carcinoma do colo do útero) (TIGRINE et al., 2013).

Efeito hepatoprotetor foi verificado em extrato bruto etanólico, frações e substâncias isoladas de *C. droserifolia* (ABDEL-KADER et al., 2009), enquanto extratos metanólicos de partes aéreas demonstraram potencial anti-inflamatório (FUSHIYA et al., 1999).

Extratos de diferentes órgãos de *C. rosea* obtidos a partir de planta de campo e de material produzido por técnicas de cultura de tecidos indicaram atividades antioxidante, anti-inflamatória (SIMÕES et al., 2006), antiviral (SIMÕES et al., 2010) e antibacteriana (SIMÕES-GURGEL et al., 2012).

Extratos obtidos a partir de material cultivado *in vivo* e *in vitro* de *C. spinosa* demonstraram potencial antineoplásico e tripanocida (MALAQUIAS et al., 2000),

antiviral (CASTRO et al., 2007), anti-inflamatório e antinociceptivo (ALBARELLO et al., 2013).

Muitos estudos fitoquímicos também têm sido realizados com espécies do gênero *Cleome* revelando a presença de uma grande variedade de classes de substâncias, incluindo terpenos, cumarino-lignoides, flavonoides, alcaloides e glicosinolatos (APARADH et al., 2012).

Triterpenos do tipo damaranos foram isolados de extratos de *C. amblyocarpa* (AHMED et al., 2001), *C. gynandra* (DAS et al., 1999), *C. africana* (NAGAYA et al., 1997; TSICHRITZIS et al., 1993) e *C. droserifolia* (EL-ASKARY, 2005). Nesta última, também foram identificados sesquiterpenos, um diterpeno e flavonoides (ABDEL-KADER et al., 2009). Em *C. brachycarpa* e *C. chrysantha*, foi reportado o isolamento de triterpenos (AHMAD; ALVI, 1987; AHMAD et al., 1986; 1990; QIN et al., 2000).

Em extratos de partes aéreas de *C. viscosa* foram identificados diterpenos cembranoides (BURKE et al., 1980; JENTE et al., 1990) e saponina (SRIVASTAVA, 1980), enquanto de sementes, foram obtidos cumarino-lignoides (KUMAR et al., 1998; RAY; CHATTOPADHYAY, 1980; RAY et al., 1985; SHARMA et al., 2010; 2012). Diterpenos cembranoides também foram isolados de partes aéreas de *C. spinosa* (COLLINS et al., 2004) e de *C. icosandra* (MAHATO et al., 1979).

Flavonoides foram isolados de extratos de partes aéreas de *C. arabica* (DJERIDANE et al., 2010), *C. gynandra* (BALA et al., 2011), *C. droserifolia*, *C. amplyocarpa*, *C. chrysantha* e *C. brachycarpa* (ABDEL-KADER et al., 2009; FUSHIYA et al., 1999; SHARAF et al., 1992; 1997).

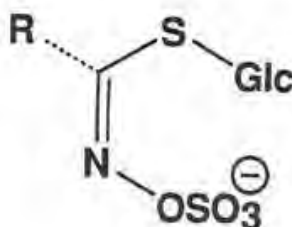
A presença de alcaloides foi reportada em frutos e flores de *C. spinosa* (BULHÕES et al., 1976), em folhas, raízes e frutos de *C. viscosa* (DHOLE et al., 2012; GAYATHRI DEVI et al., 2013), em partes aéreas e raízes de *C. chelidonii* (GANGA RAO et al., 2011), em folhas, caules e sementes de *C. rutidosperma* (ARHOGHRO et al., 2014; EDEOGA et al., 2005; NWAOGU; UDEBUANI, 2010; OJIAKO; IGWE, 2007; OKORO et al., 2015), em planta inteira de *C. paradoxa* (ABDEL-MONEM, 2012), em partes aéreas de *Cleome droserifolia* (HUSSAIN et al., 2015), em *C. gynandra* (NARENDHIRAKANNAN et al., 2005) e em *C. africana* (AL-YAHYA et al., 1983).

O gênero *Cleome* possui diversas espécies produtoras de uma classe de metabólitos que contém enxofre e nitrogênio, denominados glicosinolatos, que são marcadores taxonômicos (APARADH et al., 2012). Esta classe apresenta uma ampla diversidade estrutural, que confere atividades medicinais variadas, como fungicida, bactericida, nematocida, antineoplásica, entre outras (FAHEY et al., 2001; HALKIER; GERSHENZON, 2006). Foram identificados diferentes glicosinolatos em vinte e quatro espécies de *Cleome* (DAXENBICHLER et al., 1991; FAHEY et al., 2001).

1.4 Glicosinolatos

Os glicosinolatos compreendem um importante grupo químico cuja estrutura básica é constituída por ésteres de (Z)-N-hidroximinosulfato ligados a uma molécula de β-D-glicopiranoose, através do átomo de enxofre e a uma cadeia lateral variável (HALKIER; GERSHENZON, 2006) (Figura 1), que pode ser derivada de oito tipos de aminoácidos. Desta forma, os glicosinolatos podem ser divididos em grupos com base na estrutura química de suas cadeias laterais em alifáticos (alanina, metionina, valina, leucina ou isoleucina), aromáticos (fenilalanina ou tirosina) e indólicos (triptofano). São também divididos em sub-grupos que incluem alifáticos de cadeia reta, alifáticos de cadeia ramificada, olefínicos de cadeia reta, olefínicos de cadeia ramificada, olefínicos alcoólicos, alifáticos hidroxilados, alifáticos com grupo cetona, benzoatos, alifáticos com enxofre na cadeia, multiglicosilados e outros (FAHEY et al., 2001).

Figura 1 - Estrutura química básica dos glicosinolatos.



Legenda: R - cadeia lateral variável derivada de aminoácidos.
Adaptado de HALKIER; GERSHENZON (2006).

Já foram identificados mais de 150 glicosinolatos (NAVARRO et al., 2011), ocorrentes em, pelo menos, 16 famílias de angiospermas, incluindo Brassicaceae e Capparaceae (FAHEY et al., 2001).

A biossíntese dos glicosinolatos inicia-se pelo alongamento da cadeia de aminoácidos. O aminoácido alongado sofre descarboxilação oxidativa e N-hidroxilação, catalizada por citocromos P450, formando uma aldoxima. Posteriormente, há a formação do ácido tiohidroxímico, a partir da introdução de um enxofre proveniente da cisteína. Em seguida, a tiohidroximato glicosiltransferase (S-GT) transfere uma molécula de glicose para o ácido tiohidroxímico e a desulfoglicosinato sulfotransferase (ST) transfere um grupamento sulfato, formando a estrutura básica da molécula. Transformações secundárias, com modificações no grupo R, como oxidação, hidroxilação, metoxilação, sulfatação e glicosilação, dão origem aos diferentes grupos (FAHEY et al., 2001; HALKIER; GERSHENZON, 2006).

Em geral, os glicosinolatos ocorrem em células S, ricas em enxofre, adjacentes a células especializadas, denominadas idioblastos, que contêm a enzima mirosinase, uma β -tioglicosidase (tioglicosídeo glico-hidrolase) cujos substratos são os glicosinolatos. A enzima inicia sua atividade quando o tecido vegetal sofre algum tipo de injúria, sob ação de fungos, pela mastigação realizada por insetos, ou pela própria mastigação das plantas frescas durante o consumo humano (FAHEY et al., 2001).

Em condições favoráveis, a mirosinase promove a clivagem hidrolítica do grupamento β -glicosil do glicosinolato. A formação dos produtos de hidrólise depende tanto da estrutura do glicosinolato quanto das condições de reação (pH, presença de Fe^{2+} , presença de proteína epitioespecífica), podendo gerar isotiocianatos, nitrilas, epitionitrilas, oxazolidina-2-tionas, cianatos e tiocianatos (DAMODARAN et al., 2010).

Os glicosinolatos e mirosinases ocorrem em todos os órgãos da planta e seus níveis variam consideravelmente entre os órgãos e os diferentes estádios ontogenéticos. Em plântulas, os cotilédones têm os mais altos níveis, enquanto que em plantas, raízes geralmente têm níveis mais elevados do que folhas (VAN DAM et al., 2009), sendo maiores teores encontrados em tecidos reprodutores, tais como flores e sementes (BROWN et al., 2003; SMALLEGANGE et al., 2007).

Nas plantas, os glicosinolatos e seus produtos de hidrólise possuem diversas funções. Podem ser dissipadores de nutrientes com nitrogênio e enxofre ou funcionar como uma barreira química em resposta a problemas bióticos, reduzindo o dano causado por fitopatógenos, pragas, invertebrados aquáticos, pássaros e alguns

mamíferos. Alguns atuam como repelentes, outros como atrativos. O grande número de glicosinolatos e de isoenzimas relatado indicam que os produtos de sua hidrólise são necessários para determinada situação ou estágio de desenvolvimento. Além disso, o padrão de alocação dos glicosinolatos nos diferentes órgãos da planta pode ser uma adaptação para proteção de órgãos mais valiosos, como sementes (BONES; ROSSITER, 1996; HALKIER; GERSHENZON, 2006; HOPKINS et al., 2009).

Alguns estudos em humanos mencionam que os produtos de hidrólise dos glicosinolatos têm efeitos antinutricionais e toxicidade, sendo também apontados como potenciais agentes anticarcinogênicos. Existe uma associação do consumo de certos vegetais do gênero *Brassica* (brócolis, repolho, rabanete) e a redução do risco de câncer de pulmão, estômago, cólon, reto, ovário, endométrio e próstata, e muito disso é atribuído aos glicosinolatos e a seus produtos de transformação, como os isotiocianatos (AMBROSONE et al., 2004; DAMODARAN et al., 2010; HAYES et al., 2008; JOSEPH et al., 2004; SPITZ et al., 2000). Os isotiocianatos interferem no desenvolvimento das células cancerosas, inibindo a ativação do carcinógeno, promovendo sua desintoxicação, induzindo o bloqueio do ciclo celular, ativando a apoptose ou inibindo a metástase (HOLST; WILLIAMSON, 2004; ZHANG, 2012).

As diferentes técnicas de cultura de tecidos vegetais constituem uma alternativa promissora para a produção industrial de substâncias bioativas, incluindo os glicosinolatos.

1.5 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de metodologias de cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, em condições nutricionais e ambientais controladas, com objetivos específicos (HUSSAIN et al., 2012). Nessas técnicas, pequenos fragmentos de plantas, denominados explantes, são isolados de um vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos, em meio de cultura apropriado. Essas técnicas são possíveis devido à totipotência, capacidade apresentada pelas células vegetais, que podem ser induzidas a voltar ao estado meristemático, redefinir seu padrão de diferenciação celular, e desta forma, dar origem a novos órgãos ou a uma planta completa (CID, 2010; TERMIGNONI, 2005).

A cultura *in vitro* apresenta diversas aplicações a nível prático, além de representar um importante instrumento para estudos de mecanismos moleculares, bioquímicos, genéticos e fisiológicos do desenvolvimento de órgãos e tecidos vegetais. Sob o ponto de vista prático, a cultura *in vitro* é utilizada para a multiplicação de plantas em larga escala, eliminação de vírus, melhoramento vegetal, conservação de germoplasma *in vitro* e produção de metabólitos secundários ou especiais (CANHOTO, 2010; SATHYANARAYANA; VARGHESE, 2007; THORPE, 2012).

A existência de diferentes aplicações práticas da cultura *in vitro* deve-se ao fato de a célula ou o tecido vegetal poder responder diferentemente, quando submetida (o) a variadas condições físicas e químicas de cultivo. O crescimento e o padrão de desenvolvimento, na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, são influenciados principalmente pela suplementação hormonal ao meio de cultura, que desempenha papel fundamental sobre a resposta inicial do explante (CALDAS et al., 1998; HUSSAIN et al., 2012).

Os principais reguladores de crescimento utilizados em cultura de tecidos vegetais são as auxinas e as citocininas. O balanço entre estas duas classes de substâncias regula a formação de raízes, de parte aérea e de calos. Em geral, quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Quando a situação é inversa, ocorre a formação de brotos, e quando as proporções são aproximadamente iguais, observa-se a calogênese (CALDAS et al., 1998; HUSSAIN et al., 2012).

Dependendo do padrão de desenvolvimento da cultura, pode-se classificá-la em organizada ou desorganizada (GEORGE et al., 2008). O cultivo de estruturas organizadas compreende o isolamento asséptico de órgãos ou meristemas de plantas, a inoculação em meio de cultura e a manutenção contínua *in vitro*, permanecendo a diferenciação tecidual. Quando o objetivo é promover a micropropagação, os tipos de culturas organizadas mais importantes são: cultura de meristemas (iniciada a partir de ápice meristemático caulinar), ápices caulinares (ápice caulinar ou gema lateral), segmentos nodais (segmento caulinar contendo gema), embriões zigóticos e raízes (GEORGE et al., 2008; GUERRA; NODARI, 2006).

A cultura desorganizada, por sua vez, consiste na proliferação de massas celulares, que sofreram desdiferenciação, a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in*

vitro. As culturas desorganizadas de maior destaque as culturas de calos (cultivo de massas celulares desorganizadas em meio sólido) e células em suspensão (proliferação de células isoladas ou pequenos aglomerados dispersos em um meio líquido, sob agitação) (GEORGE et al., 2008; GUERRA; NODARI, 2006).

1.6 Cultura de tecidos vegetais como fonte de substâncias bioativas

A população mundial vem aumentando rapidamente, provocando intensa pressão sobre a área de terra cultivável disponível para produção de alimentos. Portanto, a utilização do solo para outras finalidades, como cultivo de plantas produtoras de metabólitos secundários, representa um problema. Desta forma, justifica-se o emprego de técnicas biotecnológicas para disponibilizar uma maior quantidade de material vegetal de espécies comprovadamente produtoras de substâncias bioativas (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002), além da possibilidade de realização de estudos fitoquímicos e farmacológicos, objetivando a descoberta de novos produtos de valor medicinal para o desenvolvimento de novas drogas (VANISREE et al., 2004).

Esta disponibilidade de material vegetal também evita o extrativismo de plantas consideradas medicinais. A exploração pode levar espécies nativas ao risco de extinção, causando distúrbios ecológicos e o desaparecimento de germoplasmas valiosos cujos potenciais farmacológicos e químicos sequer foram estudados (FRANÇA, 2004).

A importância de estratégias biotecnológicas para produção de metabólitos deve-se também à dificuldade da síntese de várias substâncias. Frequentemente, a síntese química apresenta alta complexidade, devido à estereoquímica da molécula, além de baixos rendimentos, tornando a produção industrial inviável economicamente (FRANÇA, 2004).

A cultura de tecidos vegetais constitui uma alternativa promissora para a produção industrial de metabólitos secundários possuindo diversas vantagens quando comparada ao cultivo convencional. A obtenção de metabólitos independente da localização geográfica e de influências sazonais e climáticas. O sistema de produção é uniforme, contínuo, rápido e com elevado rendimento, que por vezes, excede os valores encontrados na natureza. Além da produção de substâncias presentes na planta-mãe, podem ser obtidos novos metabólitos. A produção pode ser modulada pela manipulação física e/ou química das condições

de cultivo, como por exemplo, adição de elicitores ou precursores (CHATTOPADHYAY et al., 2002; FRANÇA, 2004; KARUPPUSAMY, 2009; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; VANISREE et al., 2004).

A produção *in vitro* de metabólitos farmacologicamente ativos pode ser alcançada utilizando-se tanto culturas organizadas, como brotos e raízes, quanto não organizadas, como calos e células em suspensão (FRANÇA, 2004; GEORGE et al., 2008; KARUPPUSAMY, 2009). Estratégias biotecnológicas para a produção de metabólitos de interesse já foram aplicadas a diversas espécies vegetais (Quadro 1).

Várias classes de metabólitos secundários têm sido utilizadas como princípios ativos na elaboração de medicamentos, incluindo alcaloides, terpenoides, esteroides, saponinas, fenois, glicosídeos, flavonoides, óleos voláteis e taninos (KARUPPUSAMY, 2009; VANISREE et al., 2004). Para obtenção dessas substâncias são necessárias metodologias de extração, purificação, identificação ou elucidação estrutural. Estas metodologias podem ser monitoradas utilizando-se bioensaios simplificados, que avaliam a atividade de um número elevado de amostras (extrato, fração ou substância isolada), em pouco tempo, sobre alvos específicos, como enzimas, receptores, células ou organismos (FALKENBERG et al., 2004; SCHENKEL et al., 2004).

O desenvolvimento das técnicas cromatográficas e das técnicas de elucidação estrutural, principalmente a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (EM), tem permitido acelerar a busca de novas substâncias bioativas. Atualmente, tem-se utilizado técnicas cromatográficas acopladas às técnicas de elucidação estrutural, como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrofotômetro de ultravioleta e espectrômetro de massas (CLAE/UV/EM) ou de ressonância magnética nuclear (CLAE/RMN). Outro exemplo é a cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM). Estas metodologias permitem obter rapidamente informações preliminares sobre constituintes em amostras complexas, como os extratos brutos. Além disso, têm sido empregadas para direcionar as operações de fracionamento para o isolamento de substâncias de interesse (FALKENBERG et al., 2004; SCHENKEL et al., 2004).

Para o presente trabalho foi selecionada a espécie *Cleome dendroides*, nativa e endêmica da Mata Atlântica. A grave situação de conservação deste bioma, o perfil químico e o potencial medicinal do gênero *Cleome* tornam relevante a definição de protocolos para a produção de plantas e o estabelecimento de

diferentes sistemas *in vitro*, como a cultura de órgãos, de calos e de células em suspensão, visando à produção de metabólitos de interesse de *C. dendroides*. Os resultados dos estudos que integram este trabalho serão apresentados em itens, que correspondem às propostas de artigos.

Quadro 1 - Metabólitos secundários produzidos por diferentes técnicas de cultura de tecidos vegetais.

Espécie Vegetal	Tipo de Cultura	Metabólito Secundário	Referência Bibliográfica
<i>Artemisia annua</i>	Brotos	Artemisinina	Liu et al., 1998
<i>Artemisia annua</i>	Hairy root	Artemisinina	Rao et al., 1998
<i>Artemisia annua</i>	Células em suspensão	Artemisinina	Baldi; Dixit, 2008
<i>Beeta vulgaris</i>	Hairy root	Betalaína	Taya et al., 1992
<i>Capsicum annum</i>	Calos	Capsaicina	Umamaheswari; Lalitha, 2007
<i>Catharanthus roseus</i>	Células em suspensão	Vincristina	Lee-Parsons; Rogce, 2006
<i>Catharanthus roseus</i>	Células em suspensão	Catarantina e vindolina	Ramani; Jayabaskaran, 2008
<i>Centella asiatica</i>	Calos	Asiaticosídeo	Kiong et al., 2005
<i>Centella asiatica</i>	Brotos	Asiaticosídeo	Kim et al., 2004
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Raízes	Alcaloides	Teshima et al., 1988
<i>Cinchona robusta</i>	Células em suspensão	Antraquinona	Schripsema et al., 1999
<i>Cleome rosea</i>	Calos	Antocianinas	Simões et al., 2009b
<i>Cymbopogon citratus</i>	Brotos	Óleo essencial	Quiala et al., 2006
<i>Datura stramonium</i>	Hairy root	Hiosciamina	Hilton; Rhodes, 1993
<i>Hyocyamus niger</i>	Hairy root	Alcaloides tropânicos	Jaziri et al., 1988
<i>Ipomoea cairica</i>	Calos	Lignanans	Paska et al., 1999
<i>Lycium chinense</i>	Células em suspensão	Cerebrosídeos	Jang et al., 1998
<i>Mentha arvensis</i>	Brotos	Terpenoide	Phatak; Heble, 2002
<i>Momordica charantia</i>	Calos	Flavoinoide	Agarwal; Kamal, 2007
<i>Panax ginseng</i>	Calos	Saponinas	Furuya et al., 1986
<i>Papaver somniferum</i>	Brotos	Codeína, morfina	Yoshikawa; Furuya, 1985
<i>Rauvolfia serpentina</i>	Calos	Serpentina	Salma et al., 2008
<i>Rollinia mucosa</i>	Brotos	Lignanans	Figueiredo et al., 1999
<i>Salvia officinalis</i>	Brotos	Flavonoide	Grzegorzcyk; Wysokinska, 2008
<i>Silybium mariyanm</i>	Raízes	Flavonolignana	Alikaridis et al., 2000
<i>Stevia rebaudiana</i>	Calos	Esteviosídeo	Dheeranapattana et al., 2008
<i>Taxus brevifolia</i>	Células em suspensão	Paclitaxel	Jennewein et al., 2001
<i>Taxus canadensis</i>	Células em suspensão	Paclitaxel	Hezari et al., 1997
<i>Taxus cuspidata</i>	Calos	Paclitaxel	Fett-Neto et al., 1992
<i>Vitis vinifera</i>	Células em suspensão	Antocianina	Qu et al., 2006

2 OBJETIVOS

Geral

Definir protocolos de produção de plantas e metabólitos secundários de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) sob condições *in vivo* e *in vitro*.

Específicos

- ❖ Caracterizar o processo germinativo de *C. dendroides* sob condições *in vivo* e *in vitro*;
- ❖ Definir uma metodologia eficiente de micropropagação;
- ❖ Definir um protocolo eficiente de cultura de órgãos a partir de raízes;
- ❖ Definir um protocolo eficiente para o estabelecimento de cultura de calos e cultura de células em suspensão;
- ❖ Realizar análises fitoquímicas dos materiais cultivados *in situ* e *in vitro*.

3 Caracterização do processo germinativo de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) sob condições *in vivo* e *in vitro*

3.1 Introdução

O conceito de germinação *stricto sensu*, introduzido por Evenari em 1957, envolve os eventos que ocorrem desde a embebição da semente até o início do crescimento do eixo embrionário. Os fisiologistas consideram a germinação um processo contínuo, que se inicia com a absorção de água pela semente e termina com a emergência da radícula (BLACK et al., 2006). Porém, na área de tecnologia de sementes, a germinação compreende também a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, produzindo plantas normais capazes de se estabelecer no campo (BRASIL, 2009). Este último conceito é mais abrangente, uma vez que existe interesse no estabelecimento de plantas vigorosas de valor agrônomo (BEWLEY; BLACK, 1994). Dentro desta visão, o estudo do processo germinativo e pós-germinativo inclui a germinação *stricto sensu* e o desenvolvimento da plântula.

O estudo do processo germinativo fornece informações de relevância econômica e científica. Do ponto de vista econômico, auxilia no cultivo sistemático de espécies vegetais de interesse agrícola, medicinal ou espécies nativas de interesse comercial. O conhecimento do tempo de germinação facilita o planejamento para o efetivo controle da competição com espécies invasoras herbáceas e gramíneas (BASKIN; BASKIN, 2001).

Informações sobre a germinação de sementes contribuem para uma melhor compreensão de certos conceitos biológicos, como estratégias reprodutivas das plantas e suas peculiaridades biogeográficas, uma vez que a distribuição de muitas espécies é determinada pela faixa de condições ambientais toleradas pela germinação de suas sementes (BEWLEY; BLACK, 1994). Entre os processos fisiológicos que têm recebido maior atenção estão o desenvolvimento da semente e sua maturação; a armazenagem e a mobilização das reservas; os eventos celulares e bioquímicos durante a germinação e as respostas das sementes a diversos fatores ambientais, como temperatura, umidade do solo, luz, nutrientes e salinidade (BASKIN; BASKIN, 2001).

Graças ao conhecimento fisiológico da germinação, também é possível proteger muitas espécies da ameaça de extinção, além de restaurar ecossistemas com a propagação de espécies originais e recuperar áreas degradadas, utilizando-se modelos de plantio por sementes ou de plantio por mudas (BASKIN; BASKIN, 2001; IPAM, 2013; MMA, 2013).

O acompanhamento do processo germinativo fornece dados sobre as exigências de utilização dos recursos do meio, sobre as diferentes etapas do desenvolvimento pós-seminal, as características das plântulas e possíveis tipos de anormalidades (BRASIL, 2009; LARCHER, 2000). O estudo das diferentes etapas do desenvolvimento pós-seminal de uma espécie tem sido cada vez mais utilizado, não só para o conhecimento e identificação da espécie em fase juvenil, mas também para fornecer dados importantes para trabalhos taxonômicos, filogenéticos e ecológicos (OLIVEIRA, 2001).

O processo germinativo sofre influência de fatores externos e internos. Dentre os principais fatores externos estão: água, substrato, oxigênio, temperatura e luz. Características intrínsecas, como a longevidade natural da espécie (determinada pelo genótipo), a idade fisiológica da planta-mãe, a presença de mecanismos de bloqueio (dormência), o tipo de tegumento, o estágio de maturação, a sanidade e a idade da semente, também afetam diretamente a germinação (BASKIN; BASKIN, 2001; BLACK et al., 2006; SOUZA, 2000).

Para a biotecnologia vegetal, os estudos fisiológicos da germinação sob condições *in vivo* e *in vitro* permitem a definição de metodologias que garantam o estabelecimento de estoques de plantas matrizes em boas condições fitossanitárias. O contínuo fornecimento destas plântulas atenderá aos protocolos iniciais da cultura de tecidos vegetais, nos quais servirão como fonte de explantes.

Para *C. dendroides*, não há qualquer relato sobre estudos da germinação *in vivo* ou *in vitro*, bem como sobre seu desenvolvimento pós-seminal. Desta forma, este é o primeiro trabalho sobre germinação *in vivo* e *in vitro* da espécie.

3.2 Objetivos

Geral

Caracterizar o processo germinativo de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) sob condições *in vivo* e *in vitro*.

Específicos

- ❖ Caracterizar morfológicamente e biometricamente frutos, sementes e plântulas;
- ❖ Avaliar o efeito do substrato e da temperatura sobre a germinação sob condições *in vivo*;
- ❖ Definir um protocolo de desinfestação de sementes e de germinação *in vitro* para a produção de material vegetal sob condições assépticas, visando à produção de matéria-prima para a cultura de tecidos vegetais;
- ❖ Acompanhar o processo germinativo sob condições *in vivo* e *in vitro*, caracterizando o tipo de germinação e comparando as diferentes etapas do desenvolvimento pós-seminal.

3.3 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e no Laboratório de Sementes do Núcleo de Análise de Sementes e Mudanças de Espécies Florestais, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Superintendência Federal de Agricultura no Estado do Rio de Janeiro, Unidade Maracanã.

3.3.1 Material Botânico

Foram utilizados frutos desenvolvidos em espécime de *Cleome dendroides* (Cleomaceae) localizado no Morro da Urca (22°56'60" S e 43°10'0" W), no município do Rio de Janeiro, RJ (Figura 2), entre 2009 e 2010. O material foi coletado com autorização do ICMBio, sob registro SISBIO 3299651.

Figura 2 - Exemplar de *Cleome dendroides* (Cleomaceae), localizado no Morro da Urca, Rio de Janeiro, RJ.



Legenda: Detalhe da inflorescência. Barra = 3,3 cm.
Foto: Cláudia Simões Gurgel.

A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Sebastião José da Silva Neto, do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. O material estudado encontra-se depositado no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ), sob o número de registro HRJ 11.104.

3.3.2 Caracterização morfológica e biométrica dos frutos e das sementes

Dez frutos maduros foram coletados e suas sementes, removidas. Para a aferição do comprimento, largura e espessura dos frutos e das sementes, utilizou-se um paquímetro. A descrição morfológica do fruto e da semente foi realizada com auxílio de um estereomicroscópio (Olympus mod.SD30), seguindo a terminologia de Barroso e colaboradores (1999).

3.3.3 Estabelecimento dos parâmetros iniciais do processo germinativo

Lotes de cinco sementes, retiradas de frutos maduros recém-coletados, foram colocados em cápsulas de alumínio para aferição do peso de matéria fresca (PF), em balança de precisão (AND mod. HR-200) (0,1 mg). Em seguida, foram secos em estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 h, conforme as Regras de Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), determinando-se o peso de matéria seca (PS) e grau de umidade (U). Para o cálculo de U, utilizou-se a fórmula: $U = (PF - PS) / PF \times 100$. Foram realizadas 10 repetições.

A viabilidade das sementes foi determinada através do teste topográfico de tetrazólio (BRASIL, 2009), com cinco repetições de 10 sementes. As sementes foram acondicionadas em água destilada à temperatura ambiente por 4 h, em seguida, foram seccionadas longitudinalmente e imersas em solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) 1% (p/v), por 24 h, a 30°C , sob ausência de luz. As secções foram avaliadas em estereomicroscópio (Olympus mod. SD30), quanto ao local e intensidade de coloração do embrião, a fim de distinguirem-se as sementes viáveis das não viáveis.

Para avaliar o grau de permeabilidade do tegumento, onze lotes de cinco sementes foram colocados em placas de Petri (55x10 mm) e imersos em água destilada. As sementes foram mantidas durante 24 h a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, na presença de luz branca. Durante períodos sucessivos, foi aferido o peso de matéria fresca de cada

lote, em balança de precisão (AND mod. HR-200) (0,1 mg). Foram realizadas três repetições do experimento. Os resultados foram plotados em uma curva de embebição, sendo registrados os aumentos de peso das sementes, em relação ao peso de matéria fresca inicial.

3.3.4 Germinação sob condições *in vivo*

Sementes foram lavadas com detergente comercial (10%), enxaguadas em água corrente e, em seguida, desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (p/v) acrescida de Tween 80 (0,05% p/v), durante 5 min, com três lavagens posteriores em água destilada estéril. As sementes foram colocadas em caixas plásticas tipo Gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) previamente desinfestadas com solução de NaOCl (2,5% p/v) e enxaguadas com água destilada estéril.

Foram testados três substratos previamente esterilizados em autoclave a 121°C, por 45 min: vermiculita expandida de granulação média (diâmetro médio do grão de 1,4 a 4,0 mm) (121 cm³); areia (121 cm³) e papel Germitest® (11 cm²). Os substratos foram umedecidos com 40, 25 e 10 mL de água destilada, respectivamente.

Os experimentos foram conduzidos em câmaras de germinação (Eletrolab mod. EL202), em temperaturas constantes (20 e 25°C) e alternada (20-30°C), com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 80%. Foram considerados nove tratamentos (três substratos x três temperaturas), com três repetições de 10 sementes para cada tratamento. Também foi realizado um experimento em ausência de luz, a 25°C.

As avaliações foram realizadas de dois em dois dias, durante 50 dias. Quando necessário, os substratos foram reumedecidos para manutenção da umidade em níveis adequados para a germinação e o desenvolvimento das plântulas.

3.3.5 Germinação sob condições *in vitro*

Sementes maduras foram lavadas com detergente comercial (10%), enxaguadas em água corrente, e desinfestadas em câmara de fluxo laminar. Foram testados dois protocolos de desinfestação: exposição a atmosfera saturada por formol (pastilha de paraformaldeído 80%) por 3 h e imersão em solução de NaOCl a 2,0 ou 2,5% (p/v) acrescida de Tween 80 (0,05% p/v), por 10, 15 e 20 min. Em

seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril e inoculadas em frascos de vidro (120 x 60 mm), contendo 30 mL de meio. Utilizou-se o meio de cultura básico de Murashige e Skoog (1962) (MS), com 3% de sacarose, isento de reguladores de crescimento, na composição salínica total (MS0) ou com ¼ da concentração de sais (MS¼). O pH foi ajustado para 5,8 e o meio solidificado com 0,8% de agar (Merck), antes da autoclavagem (121°C por 15 min). Os frascos foram vedados com tampas plásticas ou com dupla camada de filme PVC. Foram inoculadas quatro sementes em cada frasco, em um total de 30 frascos.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, a 26±2°C, sob intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ou em câmara de germinação (Eletrolab mod. EL202), a 20-30°C, sob intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ambas as condições sob fotoperíodo de 16 h. As avaliações foram realizadas de dois em dois dias, durante 50 dias.

3.3.6 Parâmetros de avaliação da germinação sob condições *in vivo* e *in vitro*

Os parâmetros empregados para a avaliação da germinação sob condições *in vivo* e *in vitro* foram: porcentagem de germinação (G), tempo médio de germinação (TMG), velocidade de germinação (VG) e frequência relativa de germinação (Fr). Os cálculos basearam-se na metodologia proposta por Labouriau (1983), sendo utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Porcentagem de germinação: } G = \frac{N}{A} \cdot 100$$

onde: N = número total de sementes germinadas; A = número total de sementes colocadas para germinar;

$$\text{Tempo médio de germinação: } \text{TMG} = \frac{\sum n_i t_i}{\sum n_i}$$

onde: n_i = número de sementes germinadas por dia; t_i = tempo de incubação (dias); $\sum n_i$ = número total de sementes germinadas;

$$\text{Velocidade de germinação: } \text{VG} = \frac{1}{\text{TMG}}$$

Frequência relativa de germinação em função do tempo de incubação:

$$Fr (\%) = \frac{n_i \cdot 100}{\sum n_i}$$

3.3.7 Desenvolvimento pós-seminal sob condições *in vivo* e *in vitro*

Os aspectos morfológicos das diferentes fases do processo germinativo foram registrados, desde a protrusão da radícula até a expansão das folhas primárias, quando se considerou a germinação concluída (BRASIL, 2009).

Foram avaliados os comprimentos da raiz, do hipocótilo e do epicótilo e o número de folhas. A plântula foi considerada normal quando apresentava todas as estruturas essenciais (sistema radicular bem desenvolvido, hipocótilo, dois cotilédones e epicótilo com gema apical e o par de folhas primárias expandido) em perfeito estado de desenvolvimento, conforme recomendado pela RAS (BRASIL, 2009). O registro gráfico foi feito a partir de material fresco, com auxílio do estereomicroscópio Olympus mod. SD30 e os registros fotográficos, com câmara Sony modelo H9.

3.3.8 Análise estatística

Durante a avaliação do efeito da temperatura e do substrato sobre a germinação sob condições *in vivo*, o delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com três repetições, sendo cada bloco representado por uma repetição. Foram considerados como tratamentos a combinação de três substratos com três temperaturas (esquema fatorial 3 x 3), totalizando 9 tratamentos.

Durante a análise dos parâmetros avaliados na germinação *in vitro*, cada frasco, contendo quatro sementes, foi considerado uma repetição, em um total de 30 repetições.

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Utilizou-se o programa Graphpad Prism versão 5.00.

3.4 Resultados

Nos experimentos de germinação sob condições *in vivo*, não se observou qualquer tipo de dormência nas sementes de *C. dendroides*. As combinações das temperaturas de 20, 25 ou 20-30°C e dos substratos areia ou vermiculita, promoveram alta porcentagem de germinação (93,33 a 100%) e baixo tempo médio de germinação (6,80 a 15,24 dias), além de promover um adequado desenvolvimento pós-seminal.

Definiu-se uma metodologia eficiente de germinação sob condições *in vitro*, sendo o meio MS contendo $\frac{1}{4}$ da composição salínica mais adequado. Foram comparadas as diferentes etapas do desenvolvimento pós-seminal das plântulas provenientes de germinação sob condições *in vivo* e *in vitro*. A germinação sob condições *in vitro* permitiu um desenvolvimento das plântulas mais acelerado do que *in vivo*.

Os resultados deste item juntamente com dados referentes a outras duas espécies do gênero *Cleome* constituem o artigo “Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and *in vivo* and *in vitro* germination of species of the genus *Cleome*” publicado no periódico Journal of Seed Science (Apêndice).

4 Micropropagação de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) e produção de glicosinolatos com análise comparativa *in situ* e *in vitro*

4.1 Introdução

A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de metodologias que se baseia no fato de que as células vegetais possuem informação genética necessária à regeneração de uma planta completa, ou seja, são totipotentes. Órgãos, tecidos ou células vegetais podem ser cultivados em meio de cultura adequado, sob condições assépticas, visando a diferentes objetivos (CID, 2010).

Dentre as várias aplicações da cultura de tecidos vegetais, encontra-se a propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, que consiste na propagação clonal massal de um genótipo selecionado (GUERRA; NODARI, 2006). Esta rápida produção de plantas em larga escala, em espaço reduzido, sem influência sazonal, constitui uma importante ferramenta para o fornecimento de material botânico de maneira contínua para estudos fisiológicos, biotecnológicos ou fitoquímicos. Essa técnica beneficia a produção de plantas de interesse, em escala comercial, com aplicação na agricultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), no comércio de espécies ornamentais (SOUZA et al., 1995), no reflorestamento de áreas degradadas e no reforço de populações (FERMINO-JUNIOR, et al., 2009). A micropropagação permite, ainda, a obtenção de plantas livres de patógenos (GUERRA; NODARI, 2006), o transporte internacional ou regional de germoplasma (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e a conservação de genótipos produtores de substâncias bioativas (FRANÇA, 2004).

Entretanto, alguns requisitos para o uso das técnicas podem ser enumerados, como treinamento de pessoal (HANDRO; FLOH, 1998), a aquisição de equipamentos específicos, a necessidade de desenvolvimento de protocolos diferenciados para diferentes espécies e variedades (GEORGE et al., 2008), a recalcitrância de espécies lenhosas à propagação *in vitro* e os riscos da contaminação das culturas por microrganismos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação compreende diferentes estádios: I) seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura *in vitro*; II) multiplicação através de

sucessivas subculturas; III) enraizamento das partes aéreas e subsequente aclimatização das plantas (GEORGE et al., 2008). Pode ser alcançada, dependendo do material inicial e da resposta morfogênética obtida, através da proliferação de meristemas existentes no explante original, da indução de gemas adventícias (organogênese) ou da formação de embriões somáticos (embriogênese). A organogênese e a embriogênese podem ocorrer de maneira direta ou indireta. A via direta envolve a indução de gemas adventícias diretamente nos explantes cultivados em meio de cultura. Na via indireta, ocorre inicialmente uma desdiferenciação celular, formando calos, que são definidos como uma proliferação de células de forma desordenada, e posteriormente, uma rediferenciação celular, originando tecidos. Para a micropropagação, a organogênese direta é a mais indicada, uma vez que a formação de calos pode induzir variação somaclonal (CANHOTO, 2010; CID, 2010; GEORGE et al., 2008).

O processo morfogênético é influenciado por diferentes fatores, incluindo o estágio de desenvolvimento da planta-matriz, o tipo de explante, a composição do meio de cultura, as trocas gasosas, o estado físico do meio de cultura e condições físicas do ambiente de cultura (CANHOTO, 2010; CID, 2010; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUERRA; NODARI, 2006).

As condições fitossanitárias, fisiológicas e nutricionais a que a planta-matriz está submetida são fundamentais para o sucesso do estabelecimento *in vitro* e demais etapas da micropropagação. Segundo Termignoni (2005), os explantes (pequenos propágulos formados por órgão ou pedaço de tecido) mais empregados na micropropagação são regiões juvenis (ápices e segmentos caulinares), pela grande disponibilidade na planta-matriz e por apresentarem maior capacidade de expressar a totipotência. A escolha do explante também é influenciada pelo nível de contaminação e pela estação do ano (CID, 2010). A utilização de plântulas obtidas por germinação em condições assépticas como fonte de explantes apresenta vantagens, que incluem a disponibilidade de explantes sem contaminação e a pronta capacidade de resposta à aplicação de fitorreguladores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os meios de cultura utilizados são constituídos por substâncias inorgânicas - macronutrientes (N, K, Ca, P, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Cl, Mn, Zn, B, Cu e Mo), fontes de carbono (açúcares), fitorreguladores, vitaminas e substâncias orgânicas (CALDAS et al., 1998). Os sais inorgânicos e os açúcares são essenciais

para o crescimento das plantas e influenciam a morfogênese, por meio de suas propriedades osmóticas (GEORGE et al., 2008). Diferentes combinações de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e substâncias orgânicas foram definidas, sendo que o meio básico de Murashige e Skoog (1962) tem sido o mais utilizado na multiplicação *in vitro* de diversas espécies.

Outros componentes do meio de cultura são os hormônios vegetais (de origem natural) e os reguladores de crescimento (de origem sintética), que são ativos em concentrações muito baixas (GEORGE et al., 2008). São fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As cinco classes de reguladores de crescimento reconhecidas são: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Porém, outras classes de hormônios vêm sendo estudadas, como os brassinosteroides, o ácido jasmônico e a sistemina (GEORGE et al., 2008). Os diferentes processos morfogênicos são regulados pelo balanço auxina-citocinina, as duas classes de fitorreguladores mais utilizadas em cultura de tecidos. A utilização das citocininas ou das substâncias com atividade citocinínica é indispensável ao desenvolvimento de gemas axilares e à indução de gemas adventícias. As auxinas podem ser necessárias para complementar o teor endógeno sintetizado nas gemas, ou suprir necessidades de meristemas isolados, possuindo maior aplicação na formação de raízes e calos. As giberelinas também podem ser utilizadas para estimular o crescimento de partes aéreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A morfogênese também é influenciada pelas condições físicas do ambiente de cultura, que incluem luminosidade, temperatura, umidade, fotoperíodo e dimensão dos recipientes. Em relação à luz, três características devem ser levadas em consideração: fotoperíodo, irradiância e composição espectral (CID, 2010). Outro aspecto é o microambiente dentro dos frascos de cultura, que é afetado pelo tipo de tampa, tipo de frasco e a quantidade de meio presente (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Após a fase de multiplicação, para muitas espécies são necessárias as etapas de alongamento e enraizamento dos brotos antes da transferência para condições *ex vitro*. O enraizamento pode ser realizado *in vitro* ou *ex vitro*. A escolha do sistema depende da qualidade das partes aéreas obtidas na multiplicação, da predisposição da espécie em formar raízes adventícias e da disponibilidade de

infraestrutura adequada de casa de vegetação (GEORGE et al., 2008; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A etapa de transferência da planta da condição *in vitro* para condição *ex vitro*, é denominada aclimatização. Esta é uma etapa crítica e, em alguns casos, representa um fator limitante do processo de micropropagação. Nessa fase, a planta passa de uma existência heterotrófica para um estado autotrófico, necessitando de um incremento na taxa fotossintética e na absorção de sais. A planta passa de uma condição de reduzido fluxo transpiratório, devido à baixa intensidade luminosa e à elevada umidade relativa, para um ambiente *ex vitro*, ocorrendo uma drástica redução na umidade relativa, estando a planta sujeita ao estresse hídrico e ao ataque de microrganismos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Poucos são os trabalhos na área de cultura de tecidos vegetais com o gênero *Cleome* e não existem estudos do ponto de vista biotecnológico para *Cleome dendroides*. Por se tratar de uma espécie endêmica do bioma Mata Atlântica dos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo, e considerando-se o perfil fitoquímico e o potencial medicinal do gênero, torna-se relevante o estabelecimento de um protocolo de micropropagação para a realização de análises fitoquímicas e de potencial farmacológico.

4.2 Objetivos

Geral

Definir uma metodologia eficiente de micropropagação para a espécie *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) e avaliar a produção de glicosinolatos, realizando um estudo comparativo das plantas *in situ* e *in vitro*.

Específicos

- ❖ Avaliar o efeito da origem e tipo do explante, dos tipos e concentrações de reguladores de crescimento e do número de subculturas sobre a organogênese;
- ❖ Definir uma metodologia para o alongamento e o enraizamento dos brotos;
- ❖ Definir um protocolo eficiente de aclimatização das plantas obtidas;
- ❖ Avaliar a presença de glicosinolatos em plantas de campo, produzidas *in vitro* e aclimatizadas.

4.3 Material e Métodos

Os experimentos de cultura de tecidos vegetais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os experimentos fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal/IBRAG, no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), do Departamento de Bioquímica (DBq/IBRAG) e em colaboração com a Central Analítica Fernanda Coutinho do Instituto de Química da UERJ.

4.3.1 Organogênese a partir de explantes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*

Foram utilizadas sementes maduras retiradas de frutos desenvolvidos em espécimes de *Cleome dendroides* localizados no Morro Alto Mourão (22° 58' 04" S e 43° 01' 17" W), no Parque Estadual da Serra da Tiririca, no município de Niterói, RJ.

Plântulas com 45 dias de idade desenvolvidas de sementes germinadas sob condições *in vitro* (Item 3) foram utilizadas para os experimentos de propagação *in vitro*. Foram testados explantes correspondentes à região do hipocótilo (1 cm), de lâmina foliar (1 cm²) e de raiz proximal (1 cm).

O meio de cultura contendo a formulação básica de sais e nutrientes orgânicos do meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi acrescido de diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BA) isolada ou em combinação com a auxina ácido 3-indolacético (AIA) (Tabela 1). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da solidificação, com 0,8% de ágar (Merck) e esterilização em autoclave a 121°C (1 atm), por 15 min. Em cada frasco de vidro (80 x 60 mm) contendo 30 mL de meio, foram inoculados quatro explantes, obedecendo à polaridade do órgão, no caso dos segmentos hipocotiledonares. Para os explantes foliares, a face adaxial permaneceu em contato com o meio. Os explantes radiculares foram dispostos horizontalmente ao meio. Em cada tratamento foram realizadas cinco repetições de quatro explantes.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob intensidade luminosa de $45\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

Após 30 ou 60 dias, os seguintes parâmetros foram avaliados: o tipo de resposta morfogênica, a frequência de regeneração de brotos, o número médio de brotos/explante e o comprimento médio dos brotos.

Os brotos regenerados que apresentaram comprimento igual ou superior a 0,5 cm foram individualizados e subcultivados para meio fresco de igual composição. Subculturas dos brotos foram realizadas mensalmente, por um período de 90 dias. Avaliou-se a frequência de proliferação de brotos, o número médio de brotos/explante e o comprimento médio dos brotos.

Tabela 1 - Concentração dos reguladores de crescimento suplementados ao meio MS nos experimentos de organogênese de *Cleome dendroides*.

Regulador de crescimento (mg.L^{-1})	
BA	AIA
-	-
0,5	-
1,0	-
2,0	-
3,0	-
1,0	0,1
2,0	0,2
3,0	0,3

4.3.2 Organogênese a partir de explantes de plantas propagadas *in vitro*

Brotos produzidos *in vitro* tiveram suas folhas excisadas e explantes de caule com pelo menos um nó foram inoculados em meio isento de reguladores de crescimento (MS0) (4 brotos/frasco). As culturas, mantidas em frascos de vidro (110 x 60 mm), contendo 30 mL de meio de cultura, permaneceram sob as condições

ambientais mencionadas acima. Plantas foram mantidas *in vitro* para constituir um estoque de material, em meio de cultura MS0, por sucessivas subculturas.

A partir de plantas mantidas *in vitro*, foram excisados explantes correspondentes à região do caule contendo um nó (1 cm), de lâmina foliar (1 cm²) e de raiz proximal (1 cm). Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com as mesmas combinações de reguladores de crescimento indicadas na Tabela 1. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da solidificação, com 0,8% de ágar (Merck) e esterilização em autoclave a 121°C (1 atm), por 15 min. Em cada frasco de vidro (80 x 60 mm) contendo 30 mL de meio, foram inoculados quatro explantes, obedecendo à polaridade do órgão, no caso dos segmentos de caule. Para explantes foliares, a face abaxial permaneceu em contato com o meio. Os explantes radiculares foram dispostos horizontalmente ao meio. Em cada tratamento foram realizadas cinco repetições de quatro explantes.

As culturas foram mantidas nas mesmas condições ambientais indicadas anteriormente.

Após 30 ou 60 dias, os parâmetros avaliados foram: o tipo de resposta morfogênica, a frequência de regeneração de brotos, o número médio de brotos/explante e o comprimento médio dos brotos.

Os brotos que apresentaram comprimento igual ou superior a 0,5 cm foram individualizados e subcultivados para meio fresco de igual composição. Subculturas dos brotos foram realizadas mensalmente, por um período de 90 dias. Avaliou-se a frequência de proliferação de brotos, o número médio de brotos/ explante e o comprimento médio dos brotos.

4.3.3 Alongamento e enraizamento de brotos proliferados *in vitro*

Após três subculturas, brotos com comprimento maior ou igual a 1 cm, proliferados nos meios MS suplementados com as melhores combinações de fitorreguladores, foram individualizados e inoculados em meio isento de reguladores de crescimento (MS0) ou suplementado com 1 mg.L⁻¹ de ácido indolilbutírico (AIB) (4 brotos/frasco). As culturas, mantidas em frascos de vidro (110 x 60 mm), contendo 30 mL de meio de cultura, permaneceram sob as condições ambientais mencionadas acima. Avaliou-se o alongamento dos brotos e a porcentagem de enraizamento, após 30 e 60 dias. Foram utilizadas cinco repetições de quatro brotos. O experimento foi repetido duas vezes.

4.3.4 Aclimatização

Raízes de plantas alongadas foram lavadas em água corrente para remoção do meio de cultura. Em seguida, as plantas foram colocadas em sementeiras (uma planta/célula), contendo substrato Plantmax®, mantidas em câmaras de vidro de 80 cm x 40 cm x 40 cm (C x L x h) fechadas. As câmaras permaneceram em sala com temperatura ambiente ($28\pm 3^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo natural (12 h). A tampa de vidro foi aberta lentamente, até quatro semanas, quando as plantas foram transferidas para vasos plásticos contendo substrato Plantmax®. As plantas ainda foram mantidas nas câmaras de aclimatização por mais quatro semanas, realizando-se rega semanal, com abertura gradual da tampa. Após este período, as plantas foram transferidas para condições de telado, com rega semanal, sendo determinada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

Durante o período de aclimatização foram realizadas observações diárias, durante 90 dias, com o acompanhamento do desenvolvimento das plantas, sendo avaliados tamanho, coloração e vigor das mesmas. Utilizaram-se 36 plantas. O experimento foi repetido duas vezes.

4.3.5 Análise estatística

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com cinco repetições, sendo cada bloco representado por uma repetição, contendo quatro explantes. Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p\leq 0,05$). Utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.00.

4.3.6 Análise fitoquímica

Diferentes materiais vegetais *in vivo* e *in vitro* foram analisados quanto à presença de glicosinolatos: plantas de campo (folha, caule, raiz e semente), brotos produzidos em meio MS + BA (parte aérea), plantas mantidas em estoque *in vitro* (parte aérea e raiz) e plantas aclimatizadas (parte aérea e raiz).

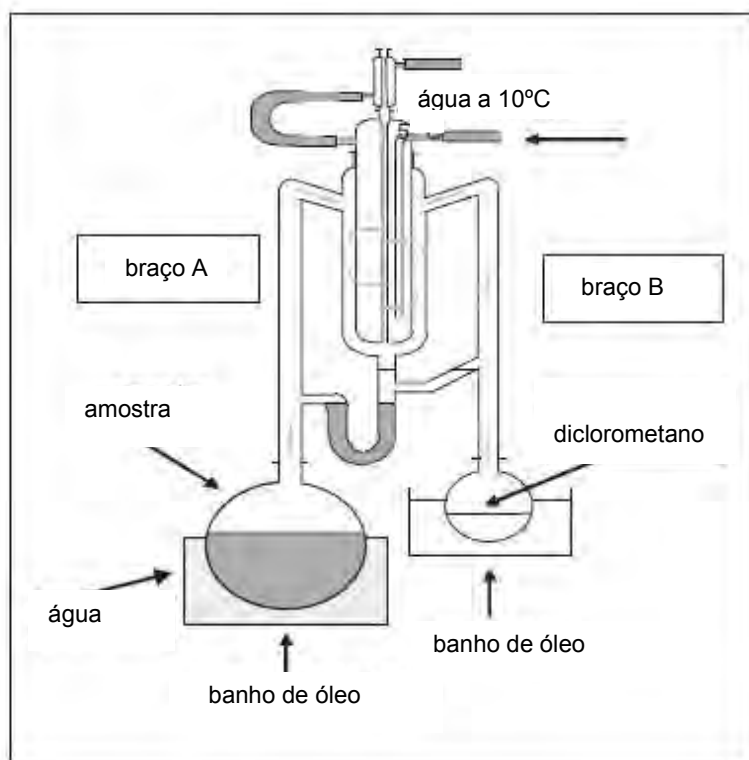
4.3.6.1 Extração

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal/IBRAG.

Extração por destilação

As substâncias voláteis presentes na amostra de sementes de *C. dendroides* foram extraídas pelo método de destilação e extração simultânea (LIKENS; NICKERSON, 1964), com o aparelho indicado na Figura 3.

Figura 3 - Aparelho de destilação e extração simultânea (LIKENS; NICKERSON, 1964).



Sementes maduras de *C. dendroides* (6 g) foram trituradas, adicionadas de água destilada (30 mL) e mantidas por 17 h sob agitação, em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), com velocidade constante de 110 rpm, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e em ausência de luz, para hidrólise. Em seguida, o material foi colocado em um balão de capacidade 50 mL, que foi conectado ao braço A, e aquecido em um banho de óleo a 110°C . Outro balão de capacidade 5 mL contendo 1 mL de diclorometano, em banho de óleo a 60°C , foi conectado ao braço B. Ao ser aquecida, a amostra liberou substâncias voláteis que atravessaram o braço A, em direção ao condensador. Por outro lado, o diclorometano, à temperatura de ebulição, evaporou e atravessou o braço B, também em direção ao condensador. Após condensarem, os voláteis da

amostra e o diclorometano foram coletados na parte inferior do extrator em forma de U.

A extração teve o início computado quando ocorreu o primeiro refluxo, permanecendo o processo de extração por 60 min. Em seguida, o balão com o extrato foi resfriado, e o extrato foi estocado em freezer até a análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Extração por partição com diclorometano

Os diferentes materiais vegetais foram triturados, adicionados de água destilada (5 mL/g) e mantidos por 17-20 h sob agitação, em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), com velocidade constante de 110 rpm, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, em ausência de luz, para hidrólise. Após este tempo, realizou-se a filtração em papel de filtro Whatman N°1, e em seguida, a partição com diclorometano P.A. numa relação de volume 1:1. A partição foi repetida por três vezes, sendo a fase aquosa descartada. A fase de diclorometano foi concentrada sob vácuo (evaporador rotativo Marconi®), a 25°C . Após cálculo do rendimento ($\text{Resíduo} / \text{Peso de matéria fresca} \times 100$), foi ressolubilizada em diclorometano grau HPLC (Vetec) a 2 mg.mL^{-1} .

As amostras foram analisadas por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

4.3.6.2 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), do Departamento de Bioquímica (DBq/IBRAG).

Extratos de sementes produzidos por ambas as técnicas (destilação e partição com diclorometano) foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). Os extratos solubilizados em diclorometano foram aplicados em placa para CCD ALUGRAM® Xtra SIL G/ UV 254 nm 20 x 10 cm, espessura de 0,20 mm (MachareyNagel®). A aplicação foi realizada em forma de banda com o auxílio de um tubo capilar. Utilizou-se como fase móvel clorofórmio/metanol (9:1 v/v). O eluente foi preparado no momento da análise.

Para as corridas cromatográficas realizadas por CCD, as placas foram eluídas em cuba cromatográfica de vidro com um volume total de eluente que não alcançava

a altura da amostra aplicada na placa de CCD. Após a eluição, quando a frente do solvente atingiu a distância de 1 cm da extremidade superior, a placa foi retirada da cuba com auxílio de pinça e transferida para capela de exaustão a fim de evaporar o solvente residual. O revelador utilizado foi o reagente de Groots (Anexo) (ASPEREN, 1950; HASHEM; WAHBA, 2000), aplicado com um borrifador, até o surgimento de bandas coloridas.

4.3.6.3 Análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), do Departamento de Bioquímica (DBq/IBRAG).

Todos os extratos dos diferentes materiais vegetais *in vivo* e *in vitro* produzidos por partição com diclorometano foram analisados por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu GCMS-QP2010 Plus equipado com coluna Rtx[®] 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm RESTEK USA), com fluxo de 1,58 mL/min, divisão de fluxo de 10:0, e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 260°C, do detector de 290°C e da interface de 200°C.

A programação da temperatura empregada foi: temperatura inicial de 50°C por 3 min, com aumento até 290°C numa razão de 3°C/min; permaneceu a 290°C por 1 min, totalizando 84 min. Foram injetados 1 µL de cada amostra com concentração de 2 mg/mL.

A faixa de varredura das razões massa/carga (m/z) foi de 40 a 500. A energia de ionização foi de 10 eV. A identificação das substâncias foi realizada por comparação do perfil de fragmentação dos espectros de massas obtidos com aqueles da biblioteca eletrônica do equipamento (NIST05.LIB) e do percentual de similaridade.

Extrato de sementes produzido por partição com diclorometano foi analisado por outro equipamento de CG-EM com a finalidade de confirmar a identificação do produto de hidrólise do glicosinolato. Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Central Analítica Fernanda Coutinho do Instituto de Química da UERJ, sob a coordenação da Profa. Dra. Mônica Regina da Costa Marques.

Foi utilizado um sistema cromatográfico automatizado Scion GC-TQ-MS 456 com injetor automático e coluna capilar Bruker BR-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil, com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). A programação da temperatura empregada foi: temperatura inicial de 50°C, com aumento até 290°C, numa razão de 3°C/min. O tempo final de análise foi de 80 min e mais 11 min para recondicionamento do equipamento. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C, e da linha de transferência, 270°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 cm³/min. O volume injetado foi de 10 μ L com divisão de fluxo de 1:10. A faixa de varredura das razões massa/carga (*m/z*) foi de 40 a 500. A identificação das substâncias foi realizada por comparação do perfil de fragmentação dos espectros de massas obtidos com aqueles da biblioteca eletrônica do equipamento (NIST 11 Mass Spectral Library) e do porcentual de similaridade.

4.4 Resultados

4.4.1 Organogênese a partir de explantes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*

A indução de gemas foi evidente em todos os explantes testados, nos meios suplementados com BA isolado ou em combinação com AIA.

4.4.1.1 Explantes de hipocótilo

Nos explantes hipocotiledonares, a indução das gemas adventícias foi observada entre uma e duas semanas em cultura. Os brotos originaram-se principalmente na zona de excisão do explante externa ao meio de cultura, ocorrendo isoladamente ou em grupos formando agregados.

Em meio de cultura isento de fitorreguladores (MS0), após 30 dias de cultivo, foi observada regeneração por organogênese direta em 100% dos explantes, porém com indução de apenas um broto por explante, em média. Observou-se o enraizamento, que ocorreu por organogênese direta, além da regeneração de brotos.

Nos meios suplementados com BA isolado ou em combinação com AIA, 56,0% a 87,5% dos explantes regeneraram brotos, com média de 1,8 a 3,4 brotos / explante (Tabela 2). Houve também a formação de calos verdes compactos nas bases dos explantes cultivados em meios suplementados com BA (Figura 4A). Em meios com BA + AIA, calos de coloração bege desenvolvidos nas bases dos explantes apresentavam interior com consistência compacta e superfície friável (Figuras 4B e 4C).

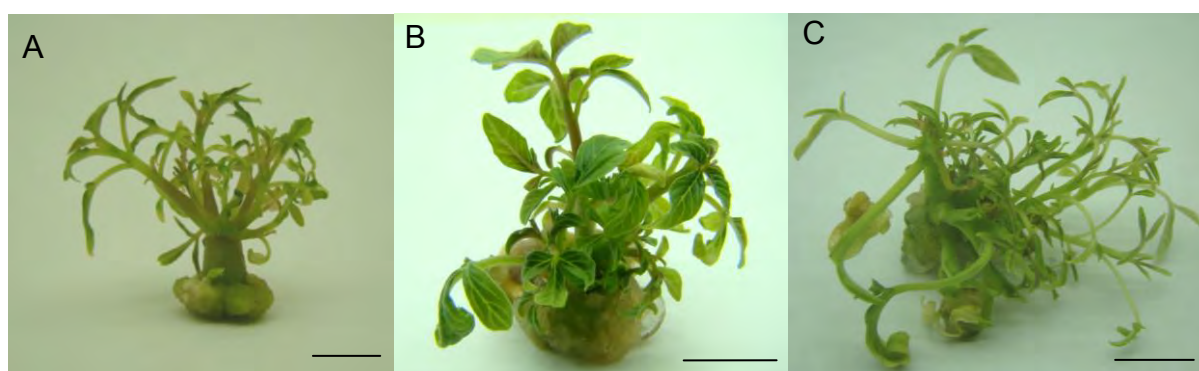
Os brotos desenvolvidos em meio contendo as maiores concentrações dos fitorreguladores (meio MS + 3 mg.L⁻¹ BA+ 0,3 mg.L⁻¹ AIA) apresentaram aspecto fenotípico anormal, com folhas de espessura menor e retorcidas (Figura 4C).

Tabela 2 - Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos de *Cleome dendroides*, a partir de explantes de hipocótilo de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 30 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Frequência de regeneração (%)	Número médio de brotos/explante	Tamanho médio de brotos (cm)
MS0	100,0±0,0 ^a	1,0±0,0 ^b	0,75±0,1 ^a
0,5 BA	56,3±18,7 ^b	1,8±0,3 ^{ab}	0,44±0,1 ^b
1,0 BA	58,8±11,8 ^b	2,2±0,5 ^{ab}	0,65±0,1 ^a
2,0 BA	62,5±12,5 ^b	2,3±0,3 ^{ab}	0,41±0,1 ^b
3,0 BA	81,3±11,9 ^{ab}	2,3±0,3 ^{ab}	0,42±0,02 ^b
1,0 BA+0,1 AIA	66,2±5,9 ^b	2,0±0,3 ^{ab}	0,71±0,05 ^a
2,0 BA+0,2 AIA	80,2±7,2 ^{ab}	3,4±0,9 ^a	0,42±0,05 ^b
3,0 BA+0,3 AIA	87,5±7,2 ^{ab}	3,3±0,7 ^a	0,50±0,05 ^{ab}

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 4 - Regeneração *in vitro* de *Cleome dendroides*, a partir de explantes hipocotiledonares de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 30 dias em cultura em meio básico MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.



Legenda: A - 2 mg.L⁻¹ BA; B - 2 mg.L⁻¹ BA + 0,2 mg.L⁻¹ AIA; C - 3 mg.L⁻¹ BA + 0,3 mg.L⁻¹ AIA.
Barras = 1 cm.

Os brotos desenvolvidos em todos os meios de cultura, com comprimento igual ou superior a 0,5 cm, foram individualizados e transferidos para meio fresco de igual composição. Foram realizados subcultivos mensais durante três subculturas.

Durante a primeira subcultura, foi constatada rizogênese direta em brotos cultivados em meio MS0, sem regeneração de brotos. Formação de raízes adventícias ocorreu ao longo de todas as subculturas, porém com aumento do número e do comprimento.

Todos os meios suplementados com reguladores de crescimento promoveram alta frequência de proliferação de brotos, sem diferença significativa, nas sucessivas subculturas (Tabela 3).

O número médio de brotos por explante (NMB), na maioria dos meios testados, aumentou sucessivamente a cada subcultura. O meio suplementado com 2 mg.L^{-1} BA destacou-se, induzindo a maior proliferação de brotos na segunda subcultura, via organogênese direta, através de gemas adventícias, e sem o desenvolvimento de brotos hiperídricos (Figura 5A) (Tabela 3).

A proliferação de brotos nos meios com o regulador de crescimento AIA ocorreu por organogênese direta, através de gemas adventícias, e por organogênese indireta a partir de calos desenvolvidos na base (Figura 5B).

A partir da segunda subcultura, em meios com adição da maior concentração de BA, isolado ou em combinação com AIA, brotos com características morfológicas diferentes foram produzidos, com folhas verde-amareladas, enrugadas e retorcidas, caule mais espesso e com aspecto hiperídrico (Figura 5C).

Figura 5 - Proliferação *in vitro* de *Cleome dendroides*, a partir de brotos produzidos em explantes hipocotiledonares de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 60 dias em cultura em meio básico MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.



Legenda: A- 2 mg.L^{-1} BA; B- 1 mg.L^{-1} BA + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA - Organogênese direta e indireta (seta); C- 3 mg.L^{-1} BA + $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA - Brotos hiperídricos (seta). Barras = 1 cm.

Tabela 3 - Frequência de proliferação, número médio e tamanho médio de brotos de *Cleome dendroides*, a partir de brotos produzidos em explantes hipocotiledonares de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, durante três subculturas mensais, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Frequência de proliferação (%)			Número médio de brotos/explante			Tamanho médio de brotos (cm)			
	Subculturas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
MS0	0 ^b	-	-	0 ^c	-	-	0 ^b	-	-	-
0,5 BA	75,0±10,2 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	1,8±0,4 ^{bc}	4,5±1,6 ^{ab}	2,7±0,3 ^b	0,60±0,2 ^a	0,70±0,05 ^a	1,10±0,2 ^a	
1,0 BA	93,8±6,2 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	3,1±0,3 ^b	4,8±0,3 ^{ab}	6,6±2,1 ^{ab}	0,62±0,05 ^a	0,80±0,1 ^a	1,00±0,2 ^a	
2,0 BA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	5,4±0,9 ^a	9,2±2,2 ^a	6,6±2,2 ^{ab}	0,80±0,1 ^a	0,80±0,1 ^a	1,00±0,1 ^a	
3,0 BA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	4,4±0,4 ^a	7,9±1,1 ^{ab+}	12,5±2,2 ^{a+}	0,60±0,2 ^a	0,60±0,2 ^a	0,50±0,08 ^b	
1,0 BA+0,1 AIA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	6,2±0,8 ^{ax}	2,6±0,3 ^{bx}	3,4±0,3 ^{bx}	0,70±0,1 ^a	0,80±0,1 ^a	0,60±0,06 ^{ab}	
2,0 BA+0,2 AIA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	4,3±0,2 ^a	7,9±1,4 ^{abx}	12,6±2,3 ^{ax}	0,70±0,1 ^a	0,55±0,1 ^a	0,55±0,05 ^b	
3,0 BA+ 0,3 AIA	100,0±0,0 ^a	92,0±8,0 ^a	100,0±0,0 ^a	5,7±0,9 ^a	4,9±0,9 ^{abx+}	7,9±1,4 ^{abx+}	0,84±0,1 ^a	0,70±0,05 ^a	0,83±0,1 ^{ab}	

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

x proliferação de brotos via organogênese indireta; + desenvolvimento de brotos hiperídricos.

4.4.1.2 Explantes de lâmina foliar

Nos explantes de lâmina foliar de plântulas obtidas de germinação *in vitro*, a indução das gemas adventícias foi observada, principalmente em meios com BA, por volta do décimo dia em cultura. Os brotos originaram-se da nervura principal e da região de excisão do pecíolo. O meio MS0, bem como os meios suplementados com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA + $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA não estimularam a regeneração de brotos, durante 30 dias de cultura.

O processo de regeneração em explantes foliares foi mais lento do que em explantes hipocotiledonares. Os brotos desenvolvidos nos diferentes meios não possuíam comprimento igual ou superior a 0,5 cm (Tabela 4), desta forma, não foram individualizados quando do subcultivo. Após 60 dias em cultura, em todos os meios suplementados com fitorreguladores observou-se regeneração de brotos.

A regeneração, na maioria dos meios testados, ocorreu por organogênese direta, apesar da formação de calos verdes duros e de calos brancos friáveis nos bordos dos explantes. Por outro lado, os meios suplementados com a maior concentração de BA (3 mg.L^{-1}), induziram regeneração por organogênese direta e indireta (Tabela 4) (Figuras 6C e 16D).

Após 60 dias em cultura, o número médio de brotos nos meios com 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA foi superior. Esses meios, ainda, promoveram um maior crescimento dos brotos (Tabela 4) (Figuras 6A e 16B). Brotos produzidos em meio com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA + $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA apresentavam-se hiperídricos (Figura 6D).

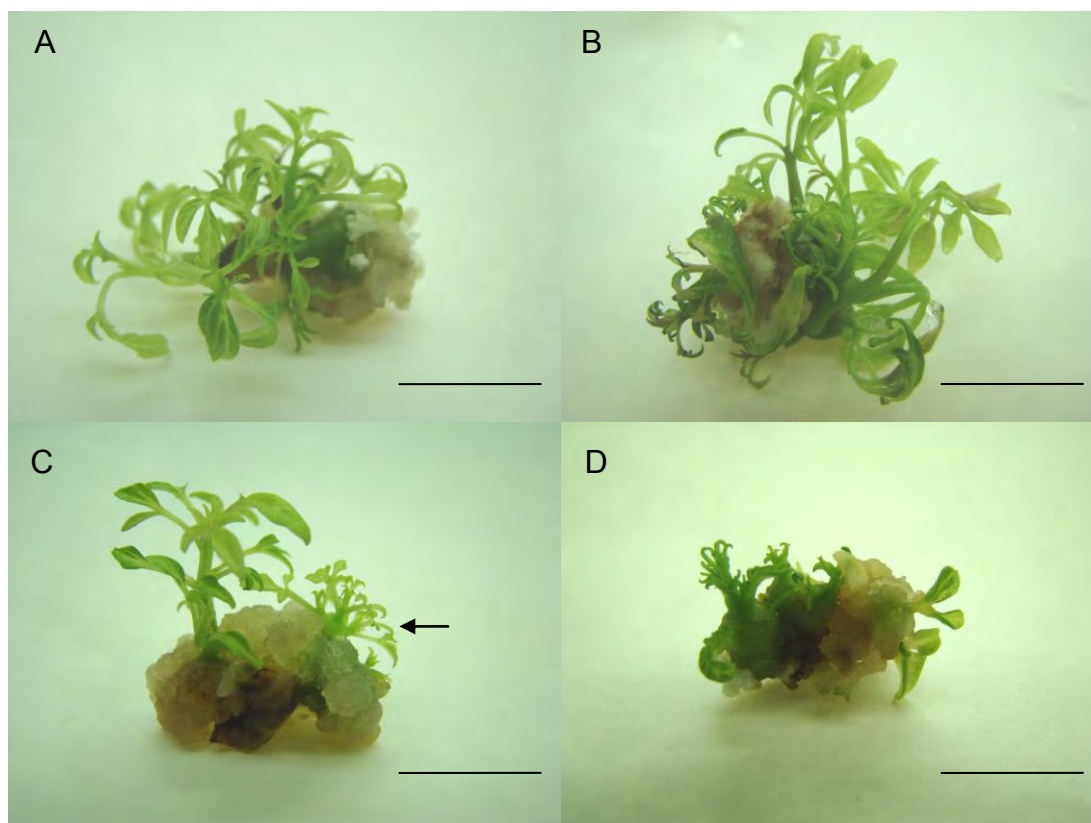
Tabela 4 - Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos de *Cleome dendroides*, a partir de explantes de lâmina foliar de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, durante 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Frequência de regeneração (%)		Número médio de brotos/explante		Tamanho médio de brotos (cm)	
	30	60	30	60	30	60
Dias em cultura	30	60	30	60	30	60
MS0	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^b	0 ^b	0 ^c
0,5 BA	12,5±7,2 ^b	31,2±11,9 ^{ab}	3,5±1,4 ^{ab}	6,5±1,1 ^a	0,40±0,1 ^a	0,60±0,1 ^a
1,0 BA	12,5±7,0 ^b	18,8±8,7 ^{ab}	5,0±1,0 ^a	6,0±1,0 ^a	0,30±0,04 ^a	0,60±0,1 ^a
2,0 BA	6,2±2,5 ^b	6,2±2,5 ^b	1,0±0,3 ^c	4,0±1,5 ^{ab}	0,30±0,03 ^a	0,40±0,04 ^b
3,0 BA	6,2±2,5 ^b	25,0±10,2 ^{ab}	3,0±0,8 ^{ab}	3,4±1,6 ^{abx}	0,30±0,02 ^a	0,40±0,06 ^b
1,0 BA+0,1 AIA	0 ^b	18,2±9,7 ^{ab}	0 ^c	4,3±0,8 ^{ab}	0 ^b	0,36±0,1 ^b
2,0 BA+0,2 AIA	0 ^b	25,0±10,2 ^{ab}	0 ^c	2,7±0,5 ^b	0 ^b	0,44±0,1 ^{ab}
3,0 BA+0,3 AIA	37,5±12,5 ^a	43,8±15,7 ^a	2,3±0,2 ^b	5,0±0,8 ^{a+x}	0,20±0,1 ^a	0,33±0,04 ^b

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

* Regeneração de brotos via organogênese indireta; + desenvolvimento de brotos hiperídricos.

Figura 6 - Regeneração *in vitro* de *Cleome dendroides* a partir de explantes de lâmina foliar de plântulas obtidas de germinação *in vitro*, após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.



Legenda: A- 0,5 mg.L⁻¹ BA; B- 1 mg.L⁻¹ BA; C- 3 mg.L⁻¹ BA - Regeneração de brotos, por organogênese direta e indireta (seta); D- 3 mg.L⁻¹ BA + 0,3 mg.L⁻¹ AIA - Formação de brotos hiperídricos. Barras = 1 cm.

4.4.1.3 Explantes de raiz

Nos explantes de raízes de plântulas *in vitro*, observou-se a indução das gemas adventícias, inicialmente, na região proximal ao hipocótilo e, posteriormente, por todo o explante.

Os brotos desenvolvidos nos diferentes meios não possuíam comprimento igual ou superior a 0,5 cm, desta forma, não foram individualizados quando do subcultivo.

Todos os meios suplementados com reguladores de crescimento induziram a regeneração de brotos em explantes de raiz, destacando-se os meios com 0,5 ou 1,0 mg.L⁻¹ BA, com maiores frequências de regeneração, após 60 dias em cultura.

Os brotos foram formados por organogênese direta em todos os meios, exceto no meio suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ BA, onde ocorreram organogênese direta e indireta. O maior valor de NMB foi obtido em meio com 1,0 mg.L⁻¹ BA, diferindo significativamente dos demais (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos de *Cleome dendroides*, a partir de explantes de raiz de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA.

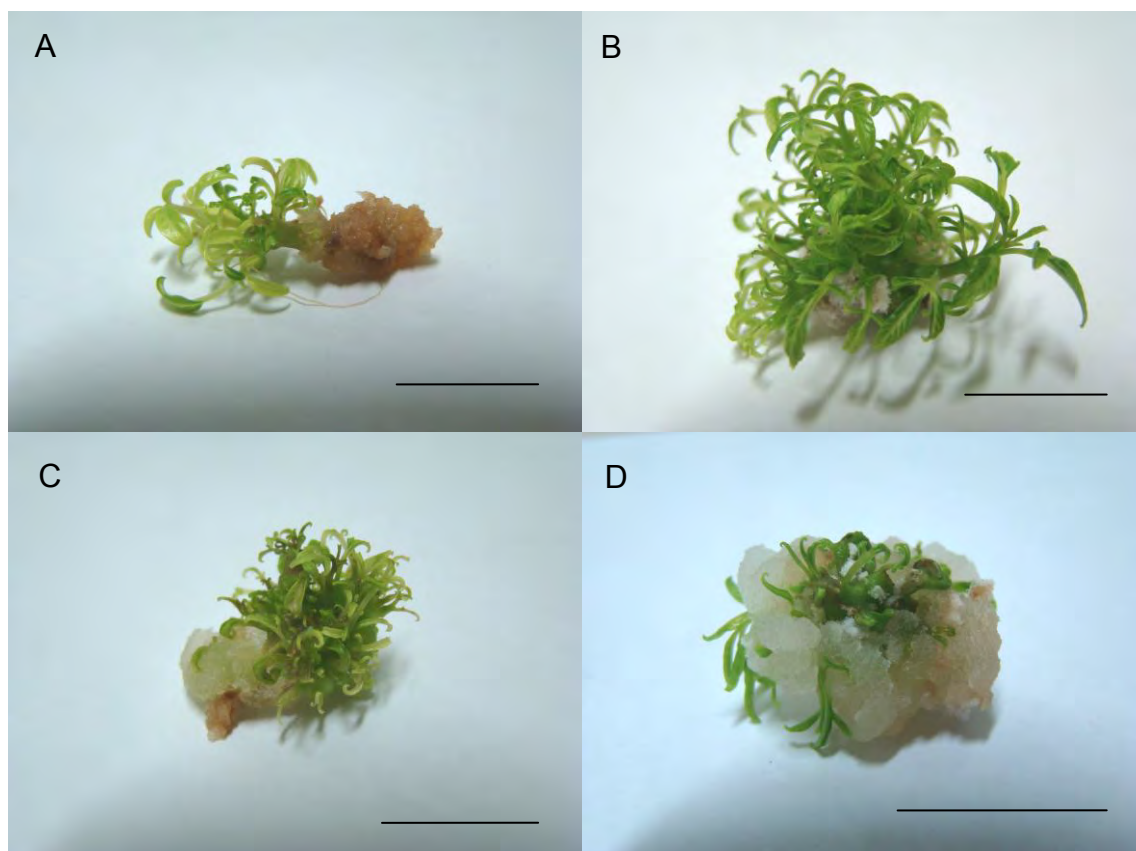
Regulador de crescimento (mg.L ⁻¹)	Frequência de regeneração (%)	Número médio de brotos/explante	Tamanho médio de brotos (cm)
MS0	0 ^c	0 ^c	0 ^b
0,5 BA	75,0±11,7 ^{ab}	5,2±0,8 ^b	0,50±0,1 ^a
1,0 BA	93,8±16,9 ^a	15,3±2,0 ^a	0,45±0,07 ^a
2,0 BA	68,8±15,9 ^b	6,8±1,7 ^b	0,43±0,1 ^a
3,0 BA	31,2±26,7 ^b	3,0±0,8 ^{cx}	0,40±0,1 ^a

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

* Regeneração de brotos via organogênese indireta.

A Figura 7 apresenta a regeneração *in vitro* de brotos nos diferentes meios utilizados, após 60 dias em cultura. Verifica-se que a concentração crescente de BA estimulou a calogênese. Calos brancos ou bege-claros friáveis desenvolveram-se, principalmente na região distal ao hipocótilo.

Figura 7 - Regeneração *in vitro* de *Cleome dendroides* a partir de explantes de raiz de plântulas obtidas de germinação *in vitro*, após 60 dias em cultura, em meio básico MS suplementado com BA.



Legenda: A- 0,5 mg.L⁻¹ BA; B- 1 mg.L⁻¹ BA; C- 2 mg.L⁻¹ BA; D- 3 mg.L⁻¹ BA. Barras = 1 cm.

4.4.2 Organogênese a partir de explantes de plantas propagadas *in vitro*

Brotos produzidos *in vitro* foram transferidos em meio MS0 com o objetivo de manter estoques de plantas *in vitro* (Figura 8), que foram utilizadas como fonte de explantes. Foram selecionados explantes de caule com 2 cm de comprimento e pelo menos um nó, os quais foram subcultivados mensalmente para meio MS0. Não foram observadas variações fenotípicas nas plantas mantidas em estoque durante sucessivas subculturas.

Figura 8 - Estoque de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro* em meio de cultura MS isento de reguladores de crescimento, após um ano de cultura.



Nota: Barra = 1 cm.

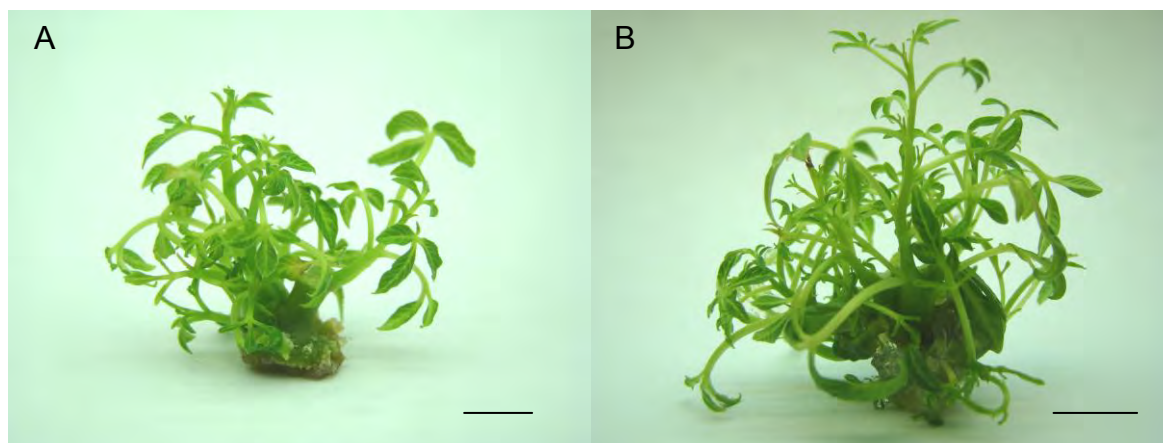
4.4.2.1 Explantes de caule

Os explantes caulinares apresentaram alta capacidade proliferativa nos primeiros 30 dias em cultura (Tabela 6), com o desenvolvimento de gemas axilares e indução de gemas adventícias. Os brotos foram formados via organogênese direta (Figura 9).

Todos os meios com fitorreguladores promoveram uma produção de brotos significativamente superior ao MS0, destacando-se o meio MS + 1,0 mg.L⁻¹ BA (Figura 9A), que apresentou um NMB superior aos demais (6,0 brotos por explante). Na maioria dos meios testados, os brotos possuíam tamanho médio maior do que 1,0 cm (Tabela 6).

Os três parâmetros avaliados (frequência de regeneração, número médio e tamanho dos brotos) a partir de explantes de caule apresentaram valores superiores quando comparados aos explantes hipocotiledonares de plântulas oriundas de germinação *in vitro*.

Figura 9 - Desenvolvimento das gemas axilares e regeneração de gemas adventícias a partir de explante caulinar oriundo de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, após 30 dias em cultura, em meio básico MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.



Legenda: A- 1 mg.L⁻¹ BA; B- 3 mg.L⁻¹ BA + 0,3 mg.L⁻¹ AIA. Barras = 1 cm.

Tabela 6 - Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos de *Cleome dendroides*, a partir de explantes de caule de plantas mantidas *in vitro*, após 30 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Frequência de regeneração (%)	Número médio de brotos/explante	Tamanho médio de brotos (cm)
MS0	100,0±0,0 ^a	1,0±0,5 ^b	1,20±0,2 ^a
0,5 BA	100,0±0,0 ^a	4,7±1,0 ^a	1,20±0,1 ^a
1,0 BA	100,0±0,0 ^a	6,0±0,3 ^a	1,09±0,1 ^a
2,0 BA	100,0±0,0 ^a	4,8±0,9 ^a	0,79±0,1 ^{ab}
3,0 BA	100,0±0,0 ^a	5,3±0,7 ^a	1,12±0,1 ^a
1,0 BA+0,1 AIA	100,0±0,0 ^a	5,4±0,6 ^a	0,66±0,2 ^b
2,0 BA+0,2 AIA	100,0±0,0 ^a	5,3±0,7 ^a	1,03±0,1 ^a
3,0 BA+0,3 AIA	95,0±11,1 ^a	5,6±0,7 ^a	1,00±0,1 ^a

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

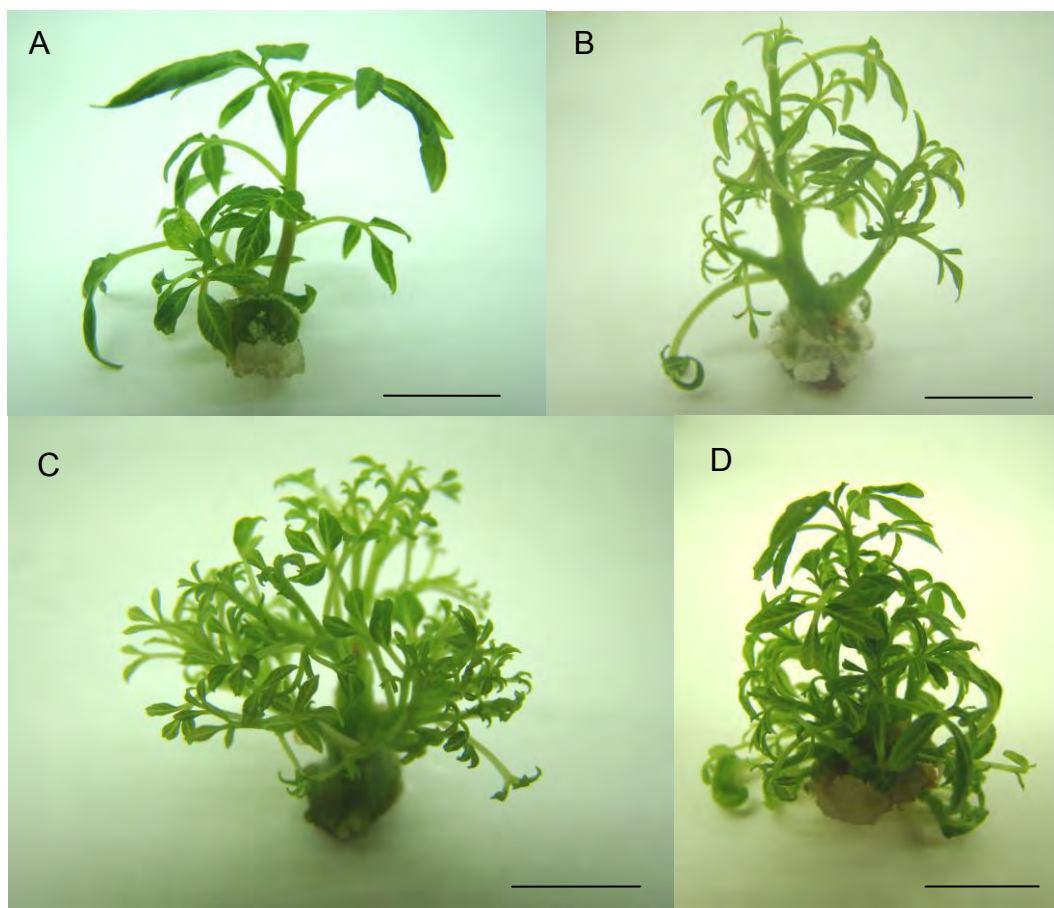
Brotos desenvolvidos em todos os meios de cultura, com comprimento igual ou superior a 0,5 cm, foram individualizados e transferidos para meio fresco de igual composição. Foram realizados subcultivos mensais durante três meses.

Os brotos cultivados nos diferentes meios com fitorreguladores mantiveram alta capacidade proliferativa (100%) durante todas as subculturas (Tabela 7). O meio MS0 não promoveu proliferação de brotos, apenas alongamento e enraizamento dos mesmos.

O número médio de brotos por explante aumentou nas primeiras duas subculturas, na maioria dos meios testados, principalmente nos meios adicionados de BA isoladamente. Após este período, houve um declínio (Tabela 7).

A proliferação a partir de explantes caulinares ocorreu por organogênese direta em todos os meios suplementados com as menores concentrações de BA isolado (0,5 a 2,0 mg.L⁻¹ BA) (Figuras 10A, 10B e 10C). Nos demais meios, ocorreu também organogênese indireta (Figura 10D) (Tabela 7).

Figura 10 - Proliferação *in vitro*, por organogênese direta, a partir brotos produzidos em explantes caulinares de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com BA.



Legenda: A- 0,5 mg.L⁻¹ BA; B- 1 mg.L⁻¹ BA; C- 2 mg.L⁻¹ BA; D- 3 mg.L⁻¹ BA - Proliferação por organogênese direta e indireta. Barras = 1 cm.

Tabela 7 - Frequência de proliferação, número médio e tamanho médio de brotos de *Cleome dendroides*, a partir brotos produzidos em explantes de caule de plantas mantidas *in vitro*, durante três subculturas mensais, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Frequência de proliferação (%)			Número médio de brotos/explante			Tamanho médio de brotos (cm)			
	Subculturas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
MS0	0 ^b	-	-	0 ^d	-	-	0 ^b	-	-	-
0,5 BA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	2,4±0,2 ^d	4,9±1,4 ^c	2,8±0,2 ^c	0,95±0,1 ^a	0,86±0,1 ^a	0,65±0,03 ^b	
1,0 BA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	5,1±0,9 ^c	5,4±0,8 ^{bc}	5,0±0,7 ^b	0,90±0,2 ^a	0,71±0,03 ^b	0,77±0,05 ^a	
2,0 BA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	4,9±0,7 ^c	7,0±1,8 ^b	7,3±0,1 ^a	0,85±0,2 ^a	0,69±0,1 ^b	0,81±0,1 ^a	
3,0 BA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	6,7±1,4 ^b	10,6±3,1 ^{abx}	7,3±0,4 ^a	0,70±0,05 ^a	0,58±0,03 ^b	0,85±0,1 ^a	
1,0 BA+0,1 AIA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	8,8±1,6 ^{bx}	8,4±2,0 ^{bx}	3,1±0,3 ^c	0,82±0,2 ^a	0,99±0,2 ^a	0,82±0,1 ^a	
2,0 BA+0,2 AIA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	9,7±2,0 ^{ax+}	13,1±2,6 ^{ax+}	6,1±0,9 ^b	0,69±0,1 ^a	0,68±0,1 ^b	0,60±0,1 ^b	
3,0 BA+0,3 AIA	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	12,8±1,1 ^{ax+}	8,6±1,4 ^{bx+}	3,3±0,4 ^c	0,89±0,1 ^a	1,11±0,3 ^a	0,90±0,1 ^a	

Legenda: Médias± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

x Proliferação de brotos via organogênese indireta; + desenvolvimento de brotos hiperídricos.

Entre os meios que só induziram proliferação via organogênese direta, o meio com 2 mg.L⁻¹ BA promoveu um aumento progressivo na produção de brotos até a 3ª subcultura, atingindo valores médios de 7,3 brotos por explante.

Os meios adicionados de 2,0 mg.L⁻¹ BA + 0,2 mg.L⁻¹ AIA e 3,0 mg.L⁻¹ BA + 0,3 mg.L⁻¹ AIA induziram a formação de brotos hiperídricos.

Comparando-se os explantes caulinares com explantes hipocotiledonares de plântulas oriundas de germinação *in vitro* observa-se alta frequência de proliferação de brotos em ambas as origens, nos diferentes meios, sendo que o meio suplementado com 2 mg.L⁻¹ BA induziu o maior NMB via organogênese direta.

4.4.2.2 Explantes de lâmina foliar

Nos explantes correspondentes à lâmina dos folíolos de plantas mantidas em estoque *in vitro*, a indução das gemas adventícias foi observada, na maioria dos meios testados, por volta da segunda semana em cultura. Os brotos originaram-se principalmente da região de excisão do pecíolo, mas também dos bordos do explante (Figuras 11 e 12).

O processo de regeneração em explantes foliares de plantas *in vitro* também foi lento, conforme observado em explantes de plântulas oriundas de germinação. Os brotos desenvolvidos nos diferentes meios não possuíam comprimento igual ou superior a 0,5 cm (Tabela 8), desta forma, não foram individualizados quando do subcultivo.

O uso do meio MS0 não propiciou a regeneração de brotos. Este tipo de explante demonstrou uma baixa frequência de regeneração, visto que em todos os meios adicionados de fitorreguladores a frequência não ultrapassou 31,2%, após 60 dias em cultura (Tabela 8).

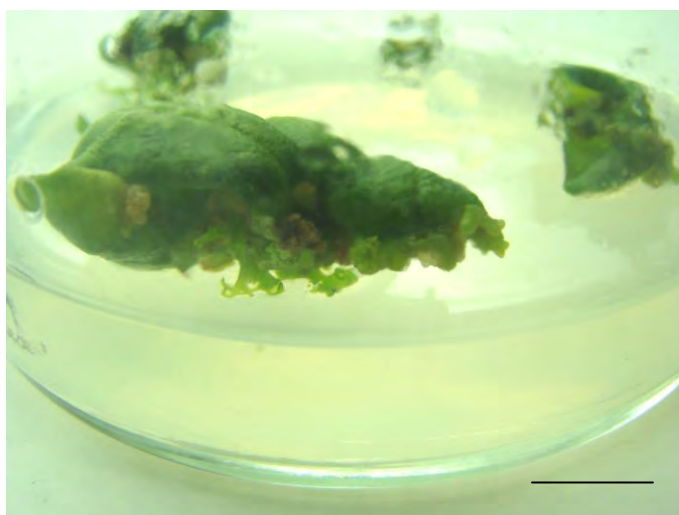
Tabela 8 - Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos, a partir de explantes de lâmina foliar de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, durante 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Frequência de regeneração (%)		Número médio de brotos/explante		Tamanho médio de brotos (cm)	
	30	60	30	60	30	60
Dias em cultura	30	60	30	60	30	60
MS0	0 ^c	0 ^b	0 ^c	0 ^b	0 ^b	0 ^d
0,5 BA	12,5±7,2 ^{ab}	12,5±7,2 ^{ab}	1,0±0,5 ^b	3,0±0,8 ^a	0,39±0,04 ^a	0,40±0,04 ^c
1,0 BA	18,8±6,5 ^a	18,8±6,2 ^{ab}	1,0±0,4 ^b	4,0±0,8 ^a	0,43±0,04 ^a	0,90±0,05 ^a
2,0 BA	12,5±7,2 ^{ab}	12,5±7,2 ^{ab}	1,5±0,5 ^a	5,0±0,5 ^a	0,40±0,04 ^a	0,87±0,05 ^a
3,0 BA	25,0±10,2 ^a	31,2±6,3 ^a	1,1±0,4 ^b	3,5±1,0 ^{a*}	0,37±0,03 ^a	0,50±0,05 ^c
1,0 BA+0,1 AIA	8,3±5,8 ^b	25,0±10,2 ^a	2,0±0,6 ^a	4,0±0,8 ^{a*+}	0,30±0,03 ^a	0,50±0,05 ^c
2,0 BA+0,2 AIA	16,7±5,9 ^a	16,7±5,9 ^{ab}	1,0±0,3 ^b	4,0±0,6 ^{a*+}	0,30±0,03 ^a	0,76±0,06 ^b
3,0 BA+0,3 AIA	16,7±11,8 ^a	16,7±5,9 ^{ab}	1,5±0,3 ^a	1,5±0,2 ^{b*+}	0,30±0,04 ^a	0,65±0,06 ^b

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

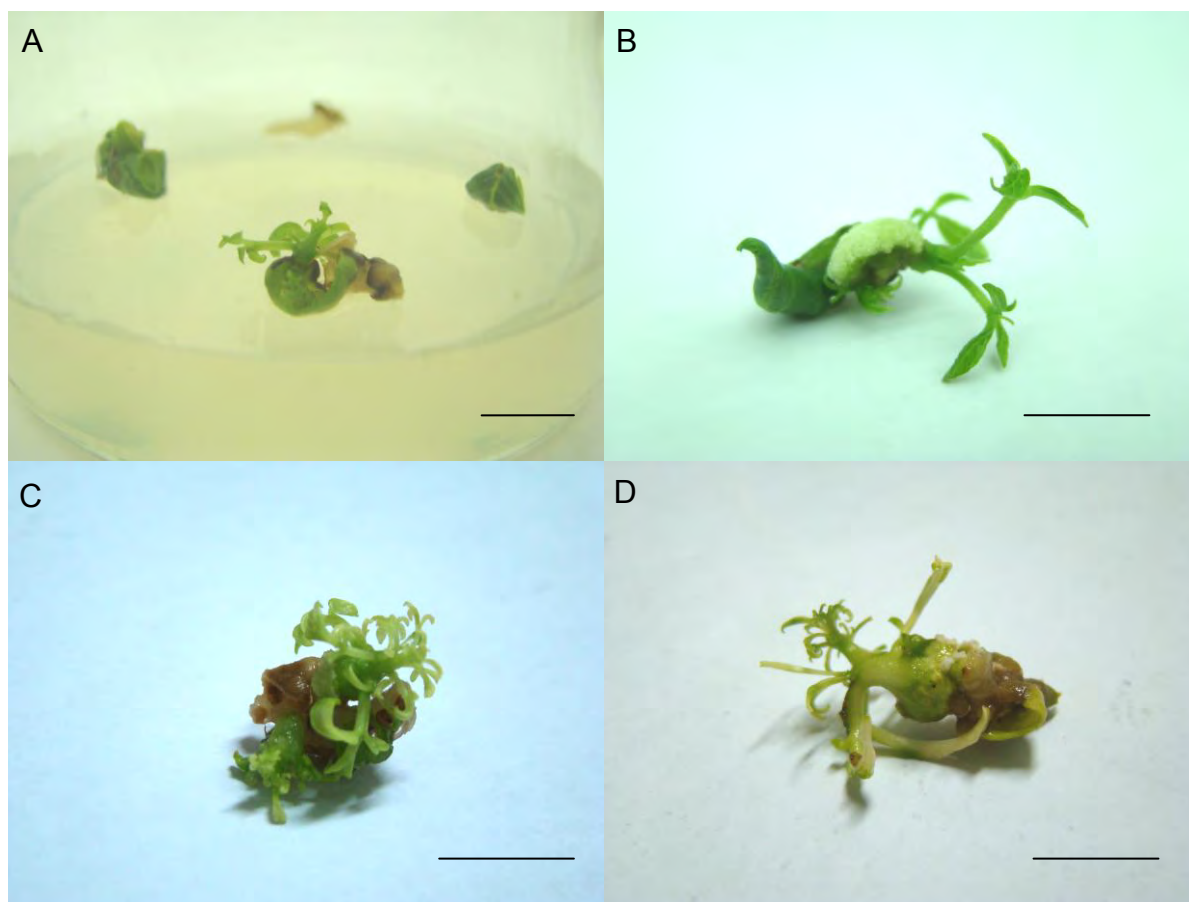
* Regeneração de brotos via organogênese indireta; + desenvolvimento de brotos hiperídricos.

Figura 11 - Regeneração de brotos, a partir de explantes de lâmina foliar, de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, após 30 dias em cultura, em meio MS suplementado com 1 mg.L⁻¹ BA.



Nota: Barra = 1 cm.

Figura 12 - Regeneração de brotos a partir de explantes de lâmina foliar de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com BA isolado ou em combinação com AIA.



Legenda: A- $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BA; B- 1 mg.L^{-1} BA; C- 2 mg.L^{-1} BA + $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA; D- 3 mg.L^{-1} BA + $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA. Barras = 1 cm.

Em meios suplementados com $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA observou-se que alguns explantes aumentaram de tamanho (Figura 11). Nos meios com AIA, verificou-se o desenvolvimento de calos brancos e beges, e de brotos com aspecto fenotípico anormal, hiperídricos (Figuras 12C e 12D).

A regeneração nos meios com $0,5$ a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA ocorreu via organogênese direta, enquanto nos demais meios ocorreu via organogênese direta e indireta. A produção de brotos foi maior no meio com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA, apesar de não diferir significativamente dos demais (Tabela 8).

4.4.2.3 Explantes de raiz

Nos explantes de raízes de plantas *in vitro*, observou-se a indução das gemas adventícias, inicialmente, na região proximal ao hipocótilo e posteriormente, por todo o explante (Figura 13).

Os brotos desenvolvidos nos diferentes meios não possuíam comprimento igual ou superior a 0,5 cm, desta forma, não foram individualizados no momento do subcultivo.

O aumento da concentração de BA promoveu um aumento progressivo da frequência de regeneração dos explantes (Tabela 9).

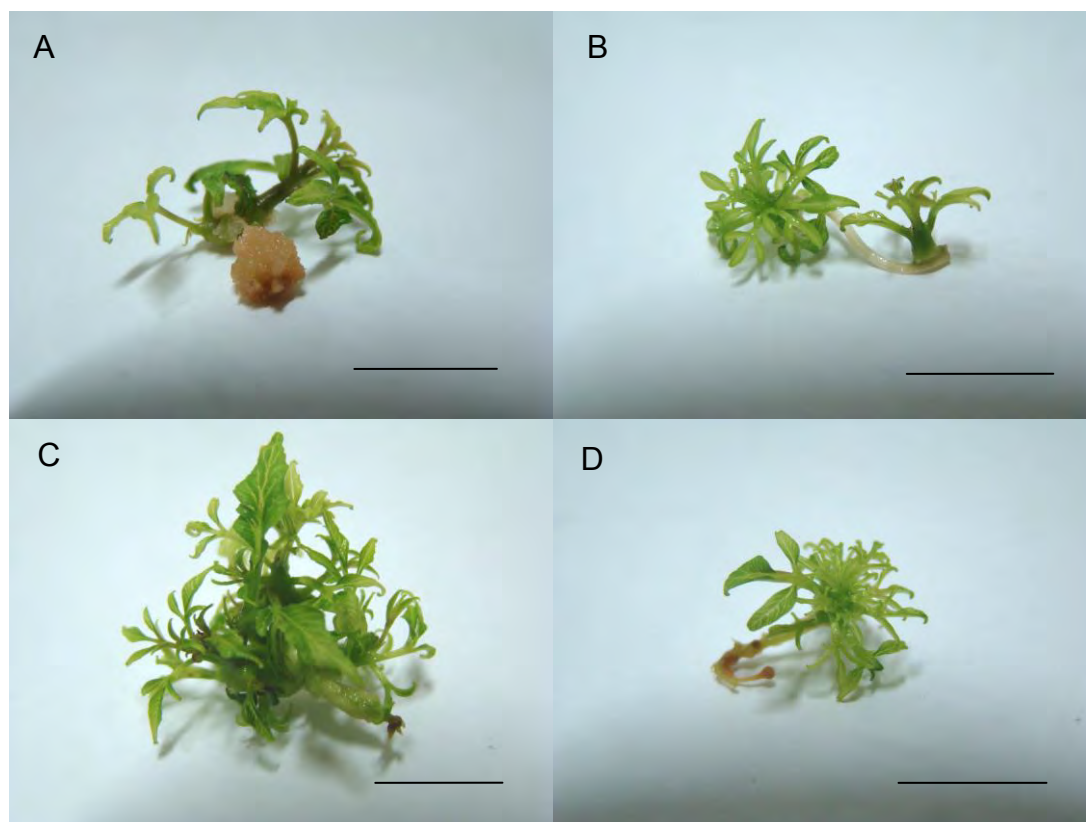
Os maiores valores de NMB foram obtidos em meios suplementados com 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ BA, via organogênese direta (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequência de regeneração, número médio e tamanho médio de brotos, a partir de explantes de raiz de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, durante 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BA e AIA.

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Frequência de regeneração (%)	Número médio de brotos/explante	Tamanho médio de brotos (cm)
MS0	0 ^c	0 ^c	0 ^d
0,5 BA	25,0±6,2 ^b	5,3±2,1 ^b	0,30±0,01 ^c
1,0 BA	87,5±15,0 ^a	5,9±1,9 ^b	0,38±0,02 ^b
2,0 BA	87,5±15,0 ^a	9,0±2,2 ^a	0,45±0,03 ^a
3,0 BA	100,0±0,0 ^a	7,8±0,2 ^a	0,48±0,02 ^a

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 13 - Regeneração de brotos a partir de explantes de raiz de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, após 60 dias em cultura, em meio MS suplementado com BA.



Legenda: A- 0,5 mg.L⁻¹ BA; B- 1 mg.L⁻¹ BA; C- 2 mg.L⁻¹ BA; D- 3 mg.L⁻¹ BA.
Barras = 1 cm.

4.4.3 Alongamento e enraizamento de brotos produzidos *in vitro*

Brotos vigorosos, produzidos no meio MS + 2,0 mg.L⁻¹ BA, a partir de explantes hipocotiledonares, após três subculturas, foram individualizados e inoculados em meio MS0 e em meio MS + 1,0 mg.L⁻¹ AIB, visando promover o alongamento e o enraizamento.

Os brotos apresentavam comprimento inicial variando entre 1 e 2 cm. Após 30 dias, constatou-se um aumento de 83% no comprimento médio dos brotos em meio MS0, contrastando, significativamente, com 100% de alongamento no meio suplementado com AIB. A taxa de enraizamento foi de 29 e 61%, respectivamente para os meios MS0 e MS + AIB, após 30 dias em cultura. O subcultivo dos brotos em meio MS0 por mais 30 dias promoveu alongamento e enraizamento significativos. Os brotos alcançaram 128% do seu comprimento inicial e 81% de enraizamento (Tabela 10).

As plantas apresentaram um aspecto vigoroso (Figura 14), com folhas de coloração verde-escura na face adaxial e tonalidade mais clara na face abaxial, similar ao observado em plantas provenientes de sementes germinadas *in vitro*. O sistema radicular era constituído por raízes com grande número de ramificações laterais.

Figura 14 - Brotos alongados e enraizados de *Cleome dendroides*, após 45 dias, em meio MS0.



Nota: Barra = 1 cm.

Tabela 10 - Efeito de diferentes pré-tratamentos no alongamento e enraizamento de brotos de *Cleome dendroides*.

Meio de cultura	Dias de cultura	Alongamento (%)	Enraizamento (%)
MS0	30	89,9±1,9 ^b	29,9±5,3 ^c
MS0	60	128,0±8,4 ^a	81,0±2,9 ^a
MS + 1 mg.L ⁻¹ AIB	30	100,0±6,6 ^a	61,0±1,6 ^b

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4.4 Aclimatização

As plantas de *C. dendroides* provenientes de diferentes pré-tratamentos de alongamento e enraizamento apresentavam comprimento inicial variando entre 2 e 4 cm. Após duas semanas da transferência para substrato, as plantas apresentavam-se vigorosas, sem emurchecimento das folhas, devido à alta umidade mantida no ambiente circundante (Figura 15).

Oito semanas após o início da fase de aclimatização (Figura 16), constatou-se um alongamento de 135% no comprimento inicial das plantas provenientes do pré-tratamento de manutenção por 60 dias em MS0. Este pré-tratamento também foi significativamente mais eficiente para a sobrevivência das plantas, obtendo-se uma taxa de 85% (Tabela 11).

Nesta fase verificou-se que os caules apresentavam de 4 a 10 cm de comprimento, sendo observado o crescimento das folhas adultas e o surgimento de novas folhas. Não foram observadas variações fenotípicas (forma e tamanho das folhas e caule) nas plantas aclimatizadas.

Figura 15 - Plantas de *Cleome dendroides* produzidas *in vitro* em fase de aclimatização após duas semanas da transferência para substrato Plantmax®.



Nota: Barra = 5 cm.

Figura 16 - Plantas de *Cleome dendroides* aclimatizadas após oito semanas da transferência para substrato.



Nota: Barra = 10 cm.

Tabela 11 - Efeito de diferentes pré-tratamentos no alongamento e sobrevivência de plantas de *Cleome dendroides*, após oito semanas de transferência para substrato.

Pré-tratamento	Alongamento (%)	Sobrevivência (%)
30 dias em MS0	41±5 ^b	57±7 ^b
60 dias em MS0	135±10 ^a	85±10 ^a
30 dias em MS + 1 mg.L ⁻¹ AIB	45±13 ^b	64±6 ^b

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.4.5 Análise fitoquímica

Para avaliação da presença de glicosinolados nos diferentes materiais vegetais *in vivo* e *in vitro* foram realizadas análises cromatográficas.

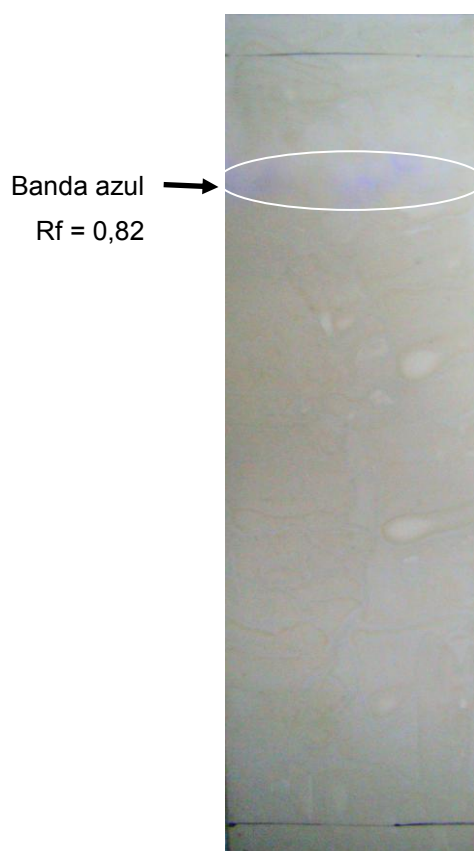
4.4.5.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Após extração por destilação e partição com diclorometano, amostras de sementes foram analisadas por CCD. A amostra extraída por partição com

diclorometano foi eluída com clorofórmio / metanol (9:1 v/v) e apresentou uma banda de coloração azul revelada pelo Reagente de Groots. O Rf (Fator de retenção) desta banda foi de 0,82 (Figura 17).

Na amostra extraída por destilação, não foi observada a banda azul, demonstrando que não houve extração do derivado de glicosinolato por esta metodologia.

Figura 17 - Cromatografia em camada delgada de extrato de sementes de *Cleome dendroides* produzido por partição com diclorometano.



Legenda: Rf: fator de retenção; eluente: clorofórmio / metanol (9:1 v/v);
revelador: Reagente de Groots.

4.4.5.2 Análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A Tabela 12 indica o rendimento da extração por partição com diclorometano dos diferentes materiais vegetais *in vivo* e *in vitro* de *C. dendroides* que foram analisados por CG-EM.

A extração de sementes provenientes de plantas de campo resultou em maior produção de resíduo (mg de resíduo / g de matéria fresca). Em relação ao material

produzido *in vitro*, a maior produção ocorreu em raízes de plantas mantidas em estoque *in vitro*.

Tabela 12 - Rendimento (%) da extração por partição com diclorometano dos diferentes materiais vegetais *in vivo* e *in vitro* de *Cleome dendroides*.

Material Vegetal	Peso de Matéria Fresca (g)	Resíduo (g)	Rendimento (%)
Folha - planta de campo	13,19	0,0200	0,1520
Caule - planta de campo	91,44	0,0174	0,0190
Raiz - planta de campo	25,37	0,0010	0,0040
Semente - planta de campo	3,17	0,0072	0,2270
Brotos multiplicados em MS + 2 mg.L ⁻¹ BA	7,96	0,0028	0,0352
Parte aérea - plantas em estoque <i>in vitro</i>	7,54	0,0125	0,1660
Raiz - plantas em estoque <i>in vitro</i>	2,00	0,0058	0,2900
Parte aérea - planta aclimatizada	6,81	0,0134	0,1970
Raiz - planta aclimatizada	2,24	0,0020	0,0893

A análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas indicou a presença de dois derivados de glicosinolatos.

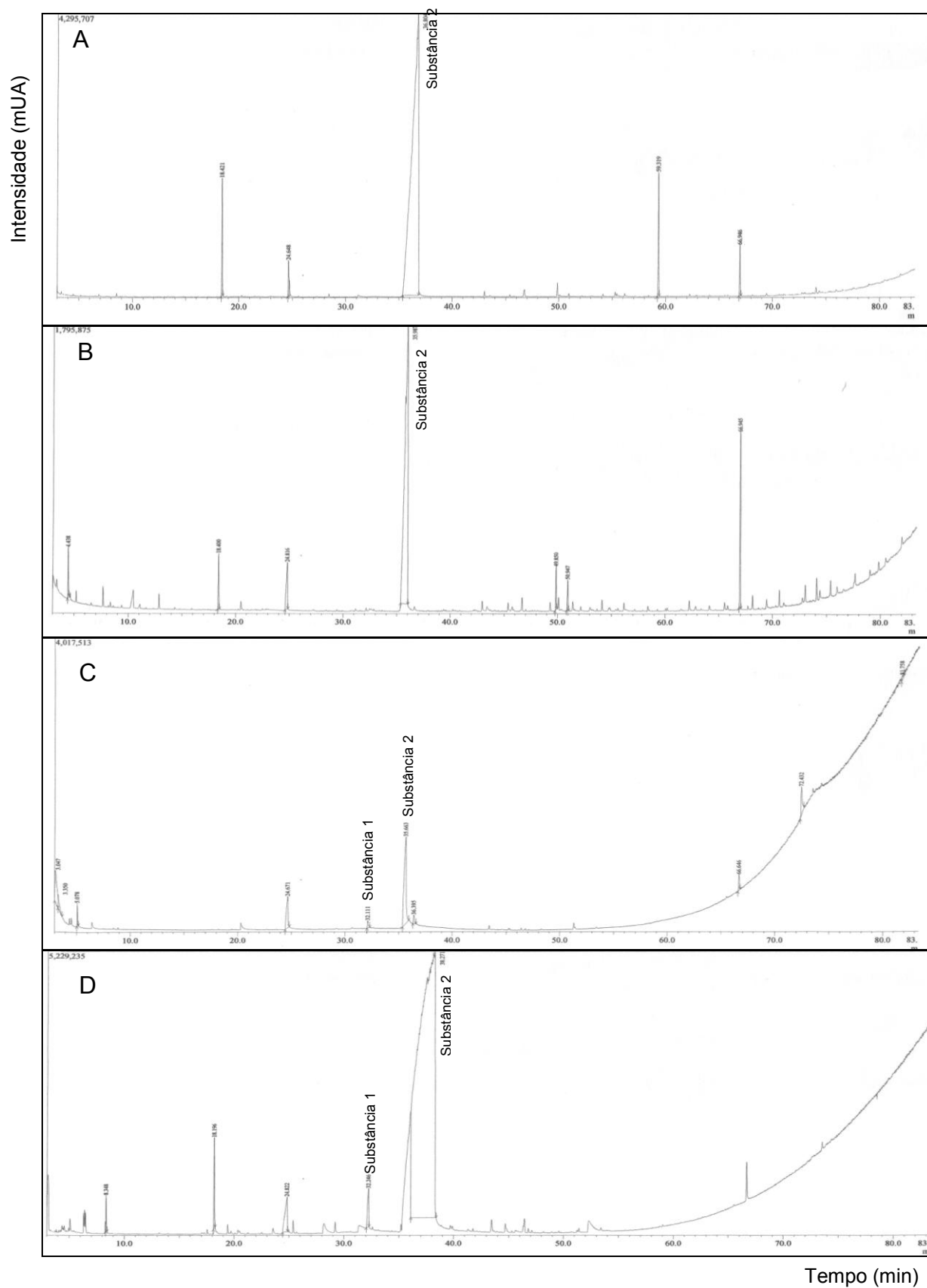
Nas plantas de campo foi verificada a presença da substância 1 nos extratos de caule e raiz, enquanto que a substância 2 estava presente em todos os extratos (semente, folha, caule e raiz) como majoritária (Figura 18).

Em relação ao material produzido *in vitro*, tanto plantas mantidas em estoque *in vitro*, quanto aclimatizadas, a substância 2 estava presente em todos os extratos. A substância 1 só foi verificada em raiz de plantas mantidas *in vitro* (Figura 19).

Em extratos de brotos mantidos em meio de multiplicação (MS + 2 mg.L⁻¹ BA) não foi verificada a produção de glicosinolatos.

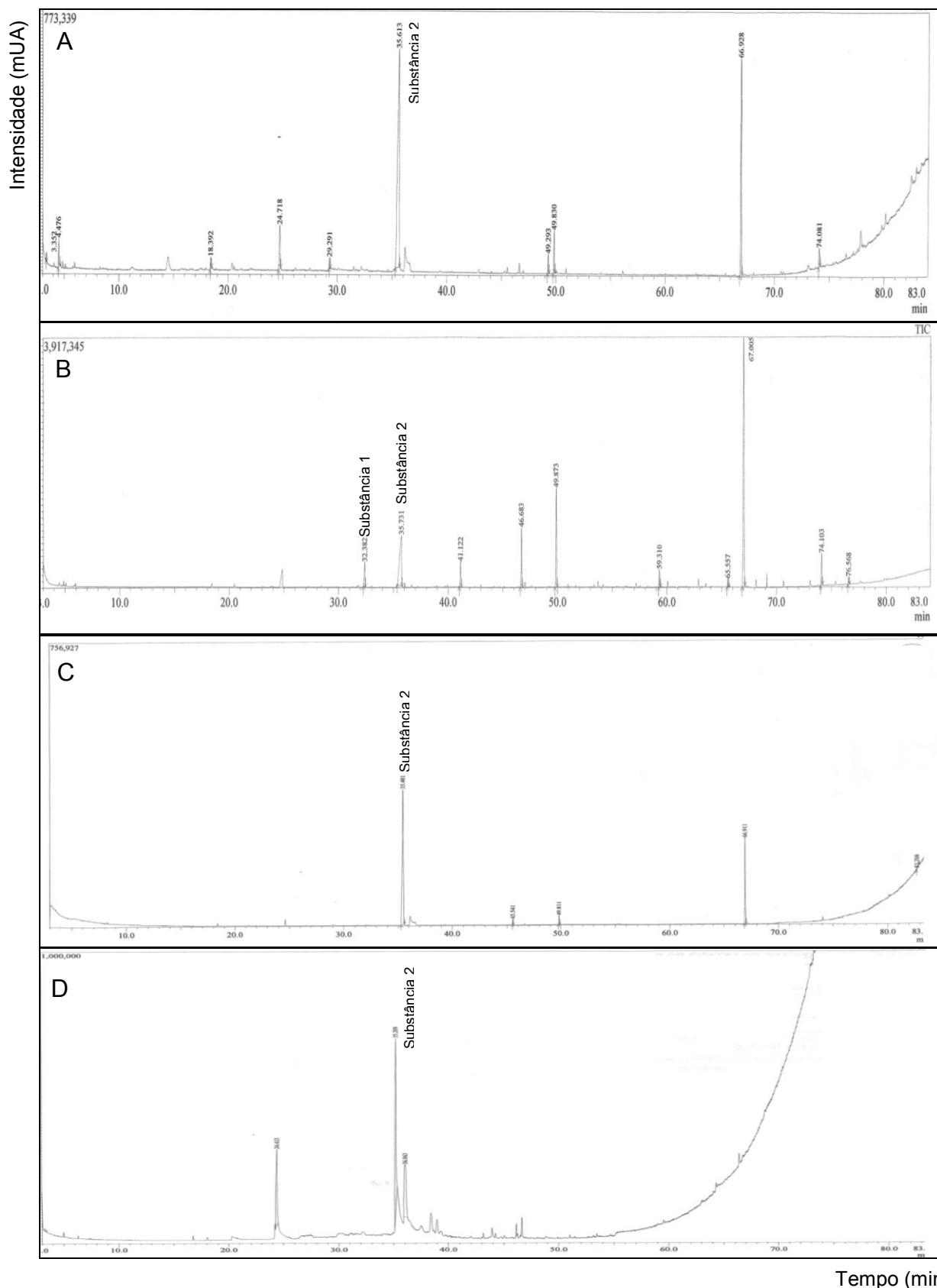
As áreas relativas à substância 1 foram inferiores a 5%. As áreas relativas à substância 2 variaram de 20,43 a 95,39%, verificando-se os maiores valores em semente (89,86%) e raiz de planta de campo (95,39%). Entre os materiais produzidos *in vitro*, destacou-se parte aérea, tanto de planta aclimatizada (71,29%), quanto de plantas mantidas *in vitro* (58,30%) (Tabela 13).

Figura 18 - Cromatogramas obtidos por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos de planta de campo de *Cleome dendroides*.



Legenda: A - semente; B - folha; C - caule; D - raiz.

Figura 19 - Cromatogramas obtidos por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos de material vegetal *in vitro* e planta aclimatizada de *Cleome dendroides*.



Legenda: A - parte aérea de plantas mantidas em estoque *in vitro*; B - raiz de plantas mantidas em estoque *in vitro*; C - parte aérea de planta aclimatizada; D - raiz de planta aclimatizada.

Tabela 13 - Tempo de retenção e concentração em porcentagem de derivados de glicosinolatos presentes nos diferentes materiais vegetais *in vivo* e *in vitro* de *Cleome dendroides*.

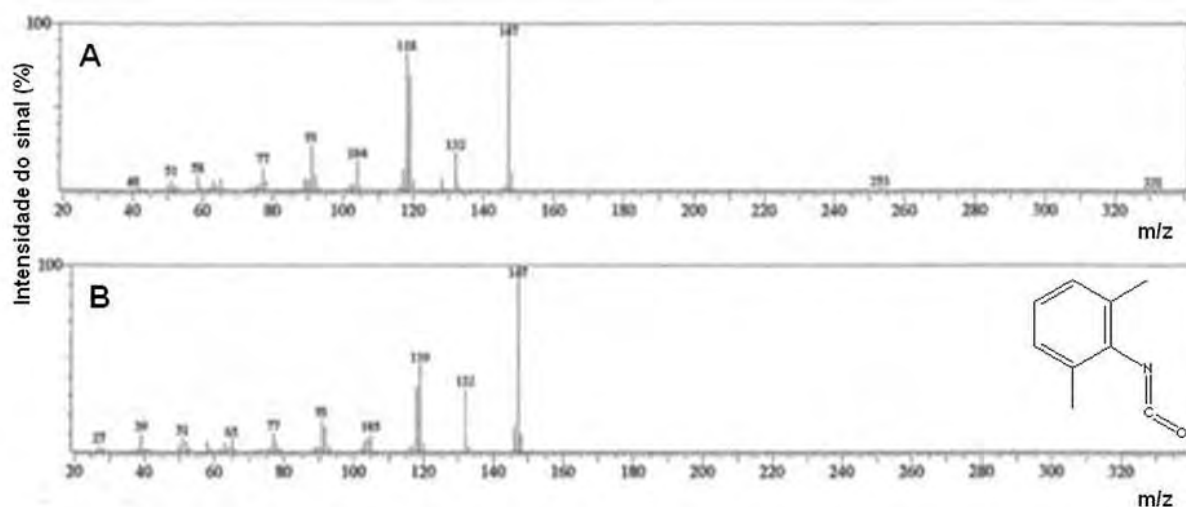
Material Vegetal	Tr1	Tr2	Conc.1 (%)	Conc.2 (%)
Semente - planta de campo	ND	36,80	-	89,86
Folha - planta de campo	ND	35,99	-	75,92
Caule - planta de campo	32,11	35,66	1,88	47,45
Raiz - planta de campo	32,25	38,27	1,06	95,39
Brotos multiplicados em MS + 2 mg.L ⁻¹ BA	ND	ND	-	-
Parte aérea - plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i>	ND	35,61	-	58,30
Raiz - plantas mantidas em estoque <i>in vitro</i>	32,38	35,73	4,05	20,43
Parte aérea - planta aclimatizada	ND	35,48	-	71,29
Raiz - planta aclimatizada	ND	36,21	-	46,89

Legenda: Tr: Tempo de retenção; Conc.: Concentração em %; ND - não detectado; 1 - relativo à substância 1; 2 - relativo à substância 2.

Na análise do extrato de raízes de plantas mantidas em estoque *in vitro*, o espectro de massas da substância com tempo de retenção 32,382 min (Figuras 19B, 20) mostrou picos de m/z : 147 (M^+), 132, 118, 104, 91, 77, 58, 51, 40. Os dados indicam que a substância tem peso molecular 147 e fórmula molecular C_9H_9NO . Todos os espectros de massa onde esta substância foi detectada apresentaram índices de similaridade iguais ou superiores a 88% quando comparados aos existentes na base de dados do equipamento (NIST05.LIB). Esta substância 1 foi identificada como 2,6-dimetilfenil isocianato, CAS 28556-81-2.

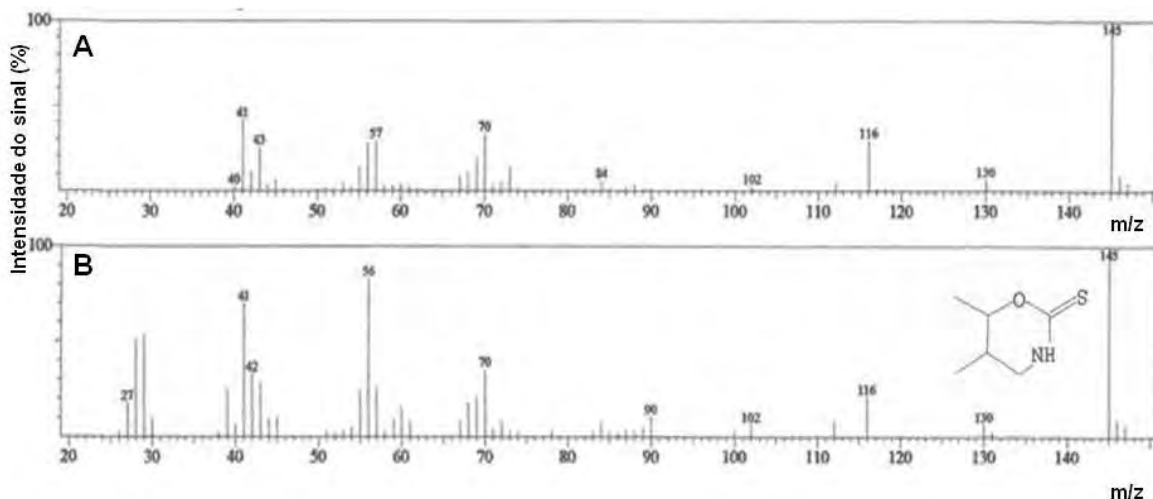
Analisando-se o extrato de semente, o espectro de massas da substância com tempo de retenção 36,804 min (Figuras 18A, 21) mostrou picos de m/z (intensidade relativa): 145 (M^+ , 100%), 130 (6,5%), 116 (29,51%), 102 (2,53%), 84 (5,90%), 70 (33,28%), 57 (29,17%), 56 (27,70%), 43 (25,31%), 41 (41,38%). Os dados indicam que a substância tem peso molecular 145 e fórmula molecular $C_6H_{11}NOS$. Todos os espectros de massa onde esta substância foi detectada apresentaram índices de similaridade iguais ou superiores a 88% quando comparados aos existentes na base de dados do equipamento (NIST05.LIB). Esta substância 2 foi identificada como 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona, CAS 85333-97-7.

Figura 20 - Espectro de massas da substância com tempo de retenção 32,382 min obtido em análise por CG-EM de extrato de raízes de plantas mantidas em estoque *in vitro* de *Cleome dendroides*.



Legenda: A - Espectro de massas da substância com tempo de retenção 32,382 min; B - Espectro de massas do 2,6-dimetilfenil isocianato encontrado na base de dados NIST05.LIB.

Figura 21 - Espectro de massas da substância com tempo de retenção 36,804 min obtido em análise por CG-EM de extrato de semente de *Cleome dendroides*.



Legenda: A - Espectro de massas da substância com tempo de retenção 36,804 min; B - Espectro de massas do 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona encontrado na base de dados NIST05.LIB.

Extrato de sementes foi analisado por outro equipamento de CG-EM com a finalidade de confirmar a identificação do produto de hidrólise do glicosinolato presente na amostra. O espectro de massas da substância de tempo de retenção 33,157 min apresentou picos de m/z (intensidade relativa): 145 (M^+ , 99,9%), 116 (31,4%), 73 (12,9%), 70 (26,1%), 69 (15,9%), 68 (91%), 67 (77%), 57 (23,5%), 56

(23,2%), 55 (11,6%). O espectro indicou índice de similaridade de 75,8% para 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona quando comparado aos dados existentes na biblioteca eletrônica do equipamento (NIST 11 Mass Spectral Library). Foi confirmada a identificação da substância: 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona, CAS 85333-97-7.

4.5 Discussão

Foi evidenciada capacidade regenerativa em todos os explantes testados, provenientes de plântulas obtidas por germinação *in vitro* e de plantas mantidas em estoque *in vitro*, em meios semi-sólidos suplementados com fitorreguladores. Este fato pode ser justificado pela adequada condição fitossanitária apresentada pelas plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro* e por ambas as origens apresentarem-se em estágio juvenil, com pronta capacidade de resposta à aplicação de fitorreguladores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Estudos desenvolvidos com outras espécies de *Cleome* também demonstraram regeneração na maioria dos tipos de explantes testados, provenientes tanto de plantas *in situ*, como de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro* (ALBARELLO et al., 2006; ANBURAJ et al., 2011; NASEEM; JHA, 1994; 1997; QIN et al., 2012; SIMÕES et al., 2002; 2004; 2009a; TSAI et al., 2012). A propagação *in vitro* de espécies herbáceas ou arbustivas, como as espécies deste gênero, geralmente alcançam resultados mais satisfatórios quando comparados a espécies arbóreas, mais recalcitrantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A escolha dos reguladores de crescimento utilizados neste trabalho baseou-se na experiência adquirida com outras espécies do mesmo gênero que são objetos de estudo em nosso laboratório: *C. rosea* e *C. spinosa*. Para *C. rosea*, o uso de BA isolado foi mais eficiente na regeneração brotos, quando comparado à cinetina isolada ou em combinação com BA (SIMÕES et al., 2004; 2009a). Resultado semelhante foi observado por Albarello e colaboradores (2006) com *C. spinosa*, em um experimento com plântulas obtidas de germinação *in vivo*.

Dentre as citocininas empregadas na cultura de tecidos vegetais, o BA induz a formação de elevado número de brotos e alta taxa de multiplicação, enquanto outras citocininas, como KIN e 2iP, permitem apenas o crescimento normal, sem favorecimento das brotações múltiplas (CALDAS et al., 1998). É muito frequente a combinação de concentrações elevadas de citocinina com concentrações baixas de auxina para estimular a multiplicação de brotos (GEORGE et al., 2008). Resultados positivos foram obtidos em experimentos com plantas axênicas de *C. spinosa*, quando a combinação da citocinina BA com a auxina AIA foi utilizada, promovendo elevada produção de brotos (ALBARELLO et al., 2006). Entretanto, quantidades excessivas de auxina estimulam a produção de calos (GRATTAPAGLIA;

MACHADO, 1998). Este problema foi evidenciado na maioria dos experimentos com *C. dendroides* em que se utilizaram BA associado com AIA. Os meios suplementados com combinações de BA com AIA não foram adequados para a micropropagação de *C. dendroides*, uma vez que estimularam a produção de calos e induziram organogênese indireta. Na regeneração por organogênese indireta existe a possibilidade de ocorrer variação somaclonal (CID, 2010).

No presente trabalho, também foi observada calogênese em diferentes explantes, em meios suplementados com a maior concentração de BA testada (3,0 mg.L⁻¹ de BA). A produção de calo na base do explante é frequentemente observada em cultura, resultante do aumento das concentrações das citocininas em meio MS (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Isto sugere que não é necessária a suplementação de elevada concentração de citocinina exógena para a produção de brotos de *C. dendroides*.

Brotos hiperídricos também foram observados em meio suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ de BA, em diferentes experimentos, após pelo menos 60 dias em cultura. Este tipo de desordem fisiológica e morfológica é um fenômeno frequente *in vitro* e dentre as causas está a alta concentração de citocinina (CID, 2010), especialmente BA (GUERRA; NODARI, 2006).

Desta forma, sugere-se o uso de concentrações mais baixas de BA para a micropropagação de *C. dendroides*, tendo em vista que as concentrações de 1 e 2 mg.L⁻¹ de BA mostraram resultados satisfatórios, a partir dos diferentes explantes testados, provenientes das duas origens, por organogênese direta. Entre os explantes provenientes de plântulas obtidas por germinação sob condições *in vitro*, hipocótilo e raízes apresentaram mais altas frequências de regeneração. A maior eficiência de regeneração a partir de explantes de plantas mantidas *in vitro*, foi observada em explantes de caule e raízes, na maioria dos meios testados. A alta frequência de regeneração observada em explantes de caule contendo um nó pode dever-se ao fato de haver simultaneamente o desenvolvimento de meristemas pré-existent e de gemas adventícias. Em contraste, explantes internodais mostraram-se mais responsivos que explantes nodais de plantas axênicas de *C. spinosa* (ALBARELLO et al., 2006). Por outro lado, em *C. rosea* observou-se que explantes hipocotiledonares, nodais e internodais apresentaram-se igualmente responsivos (SIMÕES et al., 2004).

Poucos são os trabalhos que utilizam explante de raiz com a finalidade de micropropagação. É desejável a utilização de plantas que estejam sob condições *in vitro* para o desenvolvimento deste experimento, visto que a raiz está isenta de contaminantes. Os explantes de raiz de *C. dendroides*, de ambas as origens, na maioria dos meios testados, apresentaram alta frequência de regeneração. A maior produção de brotos ocorreu em explantes oriundos de germinação *in vitro* em meio com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA (15,3 brotos/explante), por organogênese direta, após 60 dias em cultura. Esses resultados mostraram-se melhores do que os obtidos com explante de raiz proximal de *C. rosea*. Simões e colaboradores (2009a) verificaram porcentagem de regeneração máxima, por organogênese direta, de 65%, com produção máxima de 2,4 brotos por explante, após 30 dias em cultura.

Em explantes de lâmina foliar, verificou-se baixa porcentagem de regeneração (6,2 a 31,2% - em meios com BA), entretanto foram produzidos até 8,3 brotos por explante. Baixa frequência de regeneração (40%) também foi observada em explante foliar de *C. spinosa*, em meio MS com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA (TSAI et al., 2012). Resultados positivos foram obtidos por Simões (2002) com explantes de lâmina foliar de *C. rosea*, chegando a alcançar 100% de regeneração, com produção de 8,5 brotos por explante de lâmina foliar. Porém, em todos os meios testados ocorreu regeneração por organogênese direta e indireta. Este resultado diverge daqueles obtidos com *C. dendroides*, uma vez que foi possível a indução da regeneração de brotos, em alguns meios, apenas via organogênese direta.

Explantes foliares provenientes de plantas mantidas em estoque *in vitro* sofreram um aumento de tamanho quando cultivados em meios suplementados com $0,5$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BA. Naseem e Jha (1994) relataram que a lâmina foliar de *C. viscosa* cresceu em meios com as citocininas BA ou KIN (cinetina) isoladas ou em combinação com a auxina ANA (ácido 1-naftalenoacético). Outros estudos com o gênero *Cleome* (*C. spinosa* e *C. rosea*) também afirmaram que houve o alargamento da lâmina foliar, porém em meios suplementados apenas com KIN (SIMÕES, 2002; ALBARELLO et al., 2006). Quando o explante foliar de *C. rosea* foi mantido em meio apenas com auxinas, não alterou seu tamanho (SIMÕES et al., 2009b). Em todos esses trabalhos, não ocorreu regeneração de brotos nos meios que promoveram a ampliação da lâmina foliar. No entanto, explantes foliares de *C. dendroides* que sofreram aumento de tamanho apresentaram frequência de regeneração que não diferiu significativamente dos demais meios.

Para explantes de hipocótilo provenientes de plântulas obtidas por germinação *in vitro* e para explantes de caule provenientes de plantas mantidas *in vitro*, brotos regenerados foram individualizados e subcultivados mensalmente por três subculturas. A elevada capacidade proliferativa (100% na maioria dos meios) via organogênese direta foi mantida durante os três subcultivos. Resultados semelhantes foram obtidos com *C. rosea*, que manteve alta capacidade proliferativa, por organogênese direta, dos diferentes explantes testados, por sucessivas subculturas, em meios contendo BA isolado ou em combinação com KIN (SIMÕES et al., 2004). Entretanto, a capacidade decresceu após a terceira subcultura de brotos de *C. spinosa* (ALBARELLO et al., 2006). De acordo com Guerra e Nodari (2006), o declínio do vigor é um problema frequente em culturas *in vitro*. E algumas espécies apresentam acentuada diminuição da taxa de proliferação de brotos. Ainda segundo eles, o declínio varia de acordo com a espécie, o tempo de cultivo e o intervalo dos subcultivos.

No presente estudo, apesar da manutenção da alta capacidade proliferativa dos explantes hipocotiledonares e caulinares por sucessivas subculturas, o número médio de brotos sofreu declínio em alguns meios, após a segunda subcultura. Isto foi observado principalmente em brotos provenientes de explantes caulinares, possivelmente, por estarem a mais tempo em cultura, visto que são provenientes de plantas mantidas *in vitro*. O declínio da capacidade proliferativa e do número médio de brotos deve ser considerado, antes de definir-se uma estimativa de produção de brotos após várias subculturas (ALBARELLO et al., 2006).

Diante dos resultados positivos obtidos para ambas as origens das plantas, demonstra-se que a manutenção de estoques de material vegetal *in vitro* em médio prazo é eficaz para o estabelecimento de protocolos de cultura de tecidos vegetais. Além de eliminar as idas a campo para coleta, o que provoca uma intervenção, mesmo que mínima, no habitat da espécie em estudo, elimina-se o trabalho de descontaminação dos explantes. Outras espécies do gênero *Cleome* também foram mantidas em estoque, em meio sem suplementação hormonal (ALBARELLO et al., 2006; SIMÕES et al., 2009a), minimizando a possibilidade de variações somaclonais, que ocorrem durante exposição por tempo prolongado aos reguladores de crescimento (BAIRU et al., 2011).

Brotos proliferados em meio MS + 2,0 mg.L⁻¹ BA, após três subculturas, foram eficientemente alongados e enraizados (81%) em meio sem regulador de

crescimento. Algumas auxinas, como AIB e ANA, são frequentemente utilizadas para o enraizamento de brotos (GEORGE et al., 2008). Porém, no presente trabalho, não houve necessidade de suplementação ao meio de cultura, conforme relatado para *C. rosea* (SIMÕES et al., 2004) e *C. spinosa* (ALBARELLO et al., 2006). Entretanto, segundo Quin e colaboradores (2012), a adição de 0,5 mg.L⁻¹ AIB, apesar de não aumentar a taxa de enraizamento em relação ao MS0 (65%), produziu um maior número médio de raízes em *C. spinosa*. Para *C. viscosa* (NASEEM; JHA, 1994) e *C. gynandra* (NASEEM; JHA, 1997), o meio MS0 só promoveu o alongamento dos brotos, sendo necessária a transferência para meio contendo AIB para ocorrer o enraizamento. Em outro trabalho com *C. viscosa*, brotos foram eficientemente enraizados (91%) em meio MS suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ ANA (ANBURAJ et al., 2011).

A porcentagem de aclimatização alcançada (85%) encontra-se próxima àquelas obtidas para outras espécies de *Cleome*: *Cleome rosea* - de 70 a 81% (SIMÕES et al., 2004), *C. spinosa* - de 70 a 84% (ALBARELLO et al., 2006), *C. viscosa* - 85% (ANBURAJ et al., 2011).

Os glicosinolatos são os marcadores químicos do gênero *Cleome*, já identificados em vinte e quatro espécies, na maioria das vezes em sementes (APARADH et al., 2012; DAXENBICHLER et al., 1991; FAHEY et al., 2001). No presente trabalho, foram observados dois tipos de glicosinolatos, tanto em plantas de campo, incluindo nas sementes, quanto naquelas produzidas *in vitro*.

Diferentes técnicas de isolamento e identificação têm sido utilizadas para glicosinolatos. A cromatografia em camada delgada é indicada para a análise direta dos glicosinolatos ou de seus derivados. Para derivados voláteis, pode-se realizar extração por destilação e posterior análise em cromatografia com fase gasosa. Também pode ser utilizada a análise por espectrometria de ultravioleta de derivados tiourea dos isotiocianatos, entre outras técnicas (FAHEY et al., 2001). No presente estudo, optou-se por avaliar os produtos de hidrólise dos glicosinolatos presentes na espécie. As análises cromatográficas revelaram que o derivado de glicosinolato presente na amostra de sementes não foi extraído pela metodologia de destilação. Este derivado mostrou ser não volátil, a 110°C. Desta forma, todas as outras amostras foram extraídas por partição com diclorometano após hidrólise.

Na análise por cromatografia em camada delgada da amostra de sementes, a revelação pelo Reagente de Groots de uma banda de coloração azul indicou que o

derivado do glicosinolato é um hidroxiiotiocianato (HASHEM; WAHBA, 2000). Os isotiocianatos que contêm um grupo 2-hidroxialquil são instáveis. Assim que o glicosinolato que contém este grupamento é hidrolisado, o derivado 2-hidroxialquil formado sofre ciclização originando uma oxazolidina-2-tiona (DAMODARAN et al., 2010).

Atualmente, mais de 150 glicosinolatos foram identificados, com ampla diversidade estrutural (FAHEY et al., 2001; NAVARRO et al., 2011), porém, a diversidade não é aleatória (DAXENBICHLER et al., 1991). Segundo Daxenbichler e colaboradores (1991), derivados hidroxiiotiocianatos ocorrem frequentemente nos gêneros *Cleome* e *Polanisia*. A oxazolidina-2-tiona denominada glicocleomina (5-etil-5-metil-2-oxazolidinona) foi identificada em *C. arabica*, *C. arborea*, *C. chelidonii*, *C. gigantea*, *C. graveolens*, *C. integrifolia*, *C. machycarpa*, *C. ornithopodioides*, *C. pilosa*, *C. speciosissima*, *C. spinosa*, *C. trachysperma* e *C. viscosa* (AHMED et al., 1972; KJAER; THOMSEN, 1962; SONGSAK; LOCKWOOD, 2002).

A análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extrato de sementes indicou a presença de um derivado de glicosinolato majoritário, 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona, identificado pela primeira vez em plantas. Só há um relato de sua síntese química realizada por Moskovkin e colaboradores (1983), na qual, além dessa substância, foram identificados dois isômeros de posição: 4,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona; 4,5-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona. O 4,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona já foi isolado de sementes, folhas e flores de *C. chrysantha* (HASHEM; WAHBA, 2000).

Outra análise em equipamento distinto de CG-EM foi realizada com objetivo de descartar a possibilidade do derivado de glicosinolato ser um dos outros dois isômeros, tendo sido confirmada a identificação de 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona, CAS 85333-97-7, encontrado em todas as amostras de planta de campo, além das plantas mantidas em estoque *in vitro* e plantas aclimatizadas.

O armazenamento de metabólitos secundários pode ser parte da resposta de defesa contra ataque de agentes patogênicos ou ser uma adaptação para proteção de órgãos mais valiosos (HALKIER; GERSHENZON, 2006; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002). Desta forma, explica-se as maiores concentrações em sementes e raiz de planta de campo. Mas, por vezes, o local de armazenamento não

é o mesmo da síntese (KARUPPUSAMY, 2009), e acredita-se que isto se aplique aos glicosinolatos.

Existem evidências de um sistema de transporte a longa distância dos glicosinolatos. Chen e colaboradores (2001) forneceram [^{14}C]-tirosina a folhas de *Arabidopsis* e verificaram que foi formado *p*-hidroxibenzil glicosinolato marcado nas folhas. O glicosinolato marcado foi transportado para as sementes, provavelmente via floema (HALKIER; GERSHENZON, 2006). Assim sendo, é possível que a síntese do glicosinolato cujo derivado é 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona ocorra nas folhas, sendo, posteriormente transportado para os demais órgãos.

As composições qualitativa e quantitativa dos glicosinolatos nos diferentes órgãos das plantas são influenciadas pela idade da planta, por fatores ambientais, como a fertilidade do solo, por ataque de patógenos ou por reguladores de crescimento (FAHEY et al., 2001). Apesar de surgir-se que a síntese do glicosinolato cujo derivado é 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona ocorra nas folhas, em brotos mantidos em meio de multiplicação MS + 2 mg.L⁻¹ BA não foi verificada a produção de qualquer glicosinolato. Talvez a presença do regulador de crescimento, induzindo a regeneração de brotos, iniba a produção de glicosinolatos.

Além de 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona, outro derivado de glicosinolato foi identificado o 2,6-dimetilfenil isocianato em extratos de caule de planta de campo, e em raiz de planta de campo e de plantas mantidas *in vitro*.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais vêm sendo utilizadas, dentre outros objetivos, para a produção de metabólitos de interesse. Diante dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se afirmar que plantas produzidas *in vitro* de *C. dendroides* apresentaram potencial para produção contínua de biomassa e de metabólitos especiais.

4.6 Conclusões

- ❖ Meios sólidos suplementados com BA mostraram-se adequados à indução de gemas, independentemente do explante e da origem;
- ❖ O uso de BA na maior concentração (3 mg.L^{-1}) e de AIA induziu à hiperidricidade nos brotos formados;
- ❖ As sucessivas subculturas dos brotos produzidos a partir de explantes de hipocótilo e de caule promoveram um aumento gradativo na frequência de proliferação e no número médio de brotos, na maioria dos meios testados, viabilizando a manutenção do estoque de plantas *in vitro* como fonte de explantes;
- ❖ As etapas de alongamento e enraizamento *in vitro* dos brotos foram alcançadas satisfatoriamente mantendo-se os brotos em meio MS0 por 60 dias, e a posterior aclimatização resultou em 85% de taxa de sobrevivência das plantas;
- ❖ A extração de sementes por destilação não foi eficiente, indicando que o derivado de glicosinolato presente na amostra não é volátil, conforme indicado na literatura;
- ❖ Os métodos aplicados permitiram a constatação da presença de dois produtos de hidrólise de glicosinolatos: 2,6-dimetilfenil isocianato e 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tione, sendo o primeiro encontrado em amostras de caule e raiz de campo e nas raízes de plantas mantidas em estoque *in vitro*, e o segundo, em todas as amostras analisadas de material vegetal produzido *in vivo* e *in vitro*.

5 Avaliação do potencial morfogênico de raízes de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) e produção de glicosinolatos

5.1 Introdução

O sistema radicular das plantas terrestres executa duas funções principais: a aquisição de recursos do solo (água e sais minerais) e a fixação. Outras funções da raiz, tais como o armazenamento de nutrientes e a síntese de hormônios e de metabólitos são consideradas funções secundárias (FITTER, 2002).

No passado, os estudos com raízes eram dificultados pelo simples fato de sua localização subterrânea, tornando-as menos acessíveis (ESHEL, 2013). No entanto, com o desenvolvimento de novas técnicas, permitindo o crescimento do órgão isolado, grandes progressos foram alcançados, facilitando o estudo do metabolismo radicular. Hoje, sabe-se que os processos bioquímicos que ocorrem nas raízes, com liberação de micro e macromoléculas para a rizosfera, influenciam diretamente na produtividade e na estabilidade do ecossistema (FLORES et al., 1999). Desta forma, as funções do sistema radicular ditas secundárias influenciam sobremaneira na sobrevivência do vegetal, além de fornecerem produtos de interesse ao homem.

O sistema radicular apresenta capacidade notável de sintetizar uma grande gama de metabólitos secundários, em alguns casos, representando o principal local de síntese, que por muitas vezes ocorre em resposta a estresses bióticos e abióticos (FLORES et al., 1999). Muitos desses metabólitos têm despertado interesse de diversas áreas, como a produção de fármacos, a produção de pigmentos e a produção de pesticidas (FLORES et al., 1999; YANIV; BACHRACH, 2002). Para atender a crescente demanda destas áreas torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas que substituam a colheita a campo, pois, o extrativismo destrutivo, sem planejamento, pode levar a extinção da espécie (KHALAFALLA et al., 2009). Uma alternativa é o cultivo utilizando métodos tradicionais, que pode levar meses ou anos, além de estar susceptível a variações climáticas, ataque de patógenos, dentre outros fatores que podem influenciar a produção dos metabólitos (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007).

Desta forma, a cultura de raízes *in vitro*, um exemplo de cultura organizada, pode representar uma alternativa viável para a produção de metabólitos secundários

(RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007). Neste tipo de cultura, raízes isoladas são cultivadas sem conexão com o eixo caulinar, dando origem a novas raízes, que podem ser mantidas indefinidamente *in vitro* (GUERRA; NODARI, 2006). Além de raízes isoladas, outros tipos de explantes são utilizados para iniciação da cultura, como folhas (JENIFER et al., 2012; LOMBARDI et al., 2007) e caules (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007), podendo a organogênese ocorrer diretamente ou indiretamente (KIM et al., 2005; MERCY et al., 2012).

As culturas de raízes apresentam diversas vantagens. A primeira está relacionada com o reduzido ciclo de crescimento das raízes sob condições *in vitro* quando comparado ao ciclo sob condições *in vivo*, o que resulta numa produção de metabólitos em um período de tempo menor. E um agravante é a dificuldade na colheita do sistema radicular de plantas superiores que se encontram *in situ* (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

Outro ponto positivo da cultura de raízes é que a produção de algumas classes de metabólitos secundários é maior em tecidos diferenciados (cultura de órgãos) do que em tecidos indiferenciados (calos e cultura de células em suspensão). Isto porque, frequentemente, os locais de síntese e de armazenamento destes metabólitos encontram-se em compartimentos separados, representando um importante aspecto na regulação da biossíntese (VERPOORTE; ALFERMANN, 2000), havendo necessidade de certa diferenciação tecidual para sua produção (KARUPPUSAMY, 2009). Esta maior produção também ocorre porque as culturas de órgãos apresentam uma maior estabilidade genética quando comparadas às culturas indiferenciadas (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR 2002; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2007), as quais com sucessivas subculturas podem sofrer redução significativa na sua capacidade biossintética (CHATTOPADHYAY et al., 2002).

A produção em larga escala de metabólitos secundários de aplicação farmacêutica a partir de cultura de raízes tem despertado interesse comercial crescente. Estudos relativamente recentes demonstram o desenvolvimento de culturas de raízes obtidas por transformação via *Agrobacterium rhizogeneses* (*hairy roots*) e de raízes não transformadas para diferentes espécies (KARUPPUSAMY, 2009; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; VANISREE et al., 2004).

As culturas de raízes transformadas por *Agrobacterium* apresentam crescimento rápido, independente de fitorreguladores, e estabilidade genética (KARUPPUSAMY, 2009). Entretanto, muitos países não aceitam os OGMs (organismos geneticamente modificados), como Austrália, Japão, França, Coreia, Nova Zelândia etc., especialmente quando os produtos são medicamentos (CUI et al., 2010). Além disso, há casos de espécies recalcitrantes à infecção por *A. rhizogenes* (SUDHA; SEENI, 2001).

Assim sendo, a cultura de raízes não transformadas constitui uma alternativa de cultura organizada produtora de metabólitos secundários de interesse comercial (ABOUZID et al., 2010; BETSUI et al., 2004; CUI et al., 2010; KIM et al., 2005; JAMDHADE-VIJAY et al., 2012; KARUPPUSAMY, 2009; SHEKHAWAT, 2012). Este tipo de cultura necessita da suplementação de reguladores de crescimento, apresenta estabilidade genética e alta taxa de crescimento (SIVAKUMAR, 2006).

Outras aplicações das culturas de raízes são os estudos do metabolismo de carboidratos, das necessidades nutricionais, da produção de hormônios vegetais, da diferenciação do ápice radicular e do gravitropismo (KHALAFALLA et al., 2009). Essas culturas também têm sido empregadas em estudos de infecções por nematoides, de associação com fungos micorrízicos e com bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas (GEORGE et al., 2008), além de consistir em um método alternativo para a propagação clonal e a conservação de germoplasma (GEORGE et al., 2008; GUERRA; NODARI, 2006).

Estudos utilizando raízes como fonte de explantes para propagação *in vitro* de uma espécie são escassos, embora resultem em uma fonte contínua de material vegetal para cultivo *in vitro* (GOEL et al., 2009).

Diante do potencial presente na espécie e da ausência de trabalhos na área de cultura de tecidos vegetais, torna-se relevante a definição de um protocolo de cultura de raízes de *C. dendroides*, com avaliação da produção de metabólitos por esse sistema.

5.2 Objetivos

Geral

Avaliar o potencial morfogênico de raízes de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae) e avaliar a produção de glicosinolatos.

Específicos

- ❖ Avaliar o efeito da origem do explante, da concentração salínica do meio e dos tipos e concentrações de fitoreguladores sobre a proliferação de raízes *in vitro*;
- ❖ Avaliar o efeito das concentrações de reguladores de crescimento sobre a produção de brotos a partir de explantes de raiz proliferadas *in vitro*;
- ❖ Estabelecer um protocolo de manutenção da cultura de raízes e avaliar seu potencial regenerativo, após sucessivas subculturas;
- ❖ Avaliar a presença de glicosinolatos nas culturas de raízes e sua modulação pela adição de precursores e elicitores.

5.3 Material e Métodos

Os experimentos de cultura de tecidos vegetais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os experimentos fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal/IBRAG e no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), do Departamento de Bioquímica (DBq/IBRAG), da UERJ.

5.3.1 Material vegetal

Para a avaliação do efeito do tipo e da concentração dos reguladores de crescimento sobre a proliferação de raízes *in vitro*, foram utilizadas como fonte de explantes plantas de duas origens: desenvolvidas de sementes germinadas sob condições *in vitro* e mantidas em estoque *in vitro*.

Plântulas oriundas de germinação *in vitro* (Item 3) foram obtidas de sementes maduras retiradas de frutos desenvolvidos em espécimes de *Cleome dendroides* localizados no Morro Alto Mourão (22° 58' 04" S e 43° 01' 17" W), no Parque Estadual da Serra da Tiririca, no município de Niterói, RJ. Foram utilizadas plantas com 45 dias de idade.

Outra fonte foram plantas provenientes de manutenção de estoque *in vitro* (Item 4), em meio MS0, após 30-45 dias de subcultivo, quando apresentavam quantidade adequada de raízes.

5.3.2 Cultura de raízes

Explantes da raiz proximal (1,5 cm de comprimento), desprovidos de raízes laterais, de ambas as origens, foram excisados com auxílio de um bisturi, em placa de Petri contendo 10 mL de água destilada estéril para evitar a desidratação do material botânico. Em seguida, foram inoculados em meio de cultura básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na composição salínica total ou com $\frac{1}{2}$ (MS $\frac{1}{2}$) ou $\frac{1}{4}$ (MS $\frac{1}{4}$) da concentração de sais.

Para avaliar a influência dos reguladores de crescimento, o meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹) das auxinas: ácido 3-indolacético (AIA), ácido 1-naftalenoacético (ANA), ácido indolilbutírico (AIB), picloram (PIC) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da esterilização em autoclave a 121°C (1 atm), por 15 min. Em cada erlenmeyer (125 mL), vedado com tampa dupla de folha de papel alumínio, contendo 25 mL de meio líquido, foram inoculados quatro explantes. Em cada tratamento foram realizadas cinco repetições, sendo cada frasco erlenmeyer uma repetição. Cada experimento foi repetido duas vezes.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, sob agitação (100 rpm), a 26±2°C, sob intensidade luminosa de 45 µmol m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

Após 30 dias em cultura, foram avaliados o peso de matéria fresca (PF) e o peso de matéria seca (PS) das raízes, em balança de precisão (AND mod. HR-200) (0,1 mg). Para a determinação do peso de matéria seca, as raízes foram mantidas em estufa a 45°C, até peso constante. O acúmulo de biomassa foi calculado como a razão entre o peso final e o peso inicial, para ambos os parâmetros avaliados, PF e PS.

5.3.3 Regeneração de brotos

Com o objetivo de avaliar a capacidade de regenerar brotos, raízes recém-formadas foram excisadas (1 cm) e inoculadas em meio MS solidificado com 0,8% de agar e suplementado com 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ de BA (6-benzilaminopurina). Em cada frasco de vidro (80 x 60 mm) contendo 30 mL de meio, foram inoculados quatro explantes.

As culturas foram mantidas nas condições mencionadas acima.

Após 30 dias, os explantes foram subcultivados para meio fresco de igual composição, e após 60 dias, avaliou-se a frequência de regeneração de brotos e o número médio de brotos/ explante.

Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições, sendo cada frasco uma repetição. Cada experimento foi repetido duas vezes.

5.3.4 Manutenção da cultura de raízes e avaliação da capacidade regenerativa de brotos

Raízes recém-formadas foram excisadas (1,5 cm) e inoculadas em meio MS líquido de igual composição, durante quatro subculturas mensais.

Após cada subcultura, foram avaliados o peso de matéria fresca e o peso de matéria seca, e calculado o acúmulo de biomassa das raízes.

Durante cada subcultivo, raízes recém-formadas foram excisadas (1 cm) e inoculadas em meio MS solidificado com 0,8% de agar e suplementado com 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ de BA.

Após 30 dias em cultura, os explantes foram subcultivados para meio fresco de igual composição, e após 60 dias, avaliou-se a frequência de regeneração de brotos e o número médio de brotos/ explante.

As culturas foram mantidas nas condições anteriormente mencionadas.

Cada experimento, contendo cinco repetições de quatro explantes, foi repetido duas vezes.

5.3.5 Adição de elicitores e precursores na cultura de raízes

Explantes correspondentes à raiz proximal (1,5 cm de comprimento), desprovidos de raízes laterais, de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, foram excisados com auxílio de um bisturi, em placa de Petri contendo água destilada estéril. Em seguida, foram inoculados em meio de cultura MS com 3,0 mg.L⁻¹ de ácido indolilbutírico (AIB). Para avaliação da elicitação, os meios foram suplementados com diferentes elicitores (ácido salicílico - 0,125 e 0,25 mg.L⁻¹; extrato de levedura - 1,25 e 2,5 mg.L⁻¹; metiljasmonato - 0,125 e 0,25 mg.L⁻¹; quitosana - 1,25 e 2,5 mg.L⁻¹). Foi utilizado como controle meio MS com 3,0 mg.L⁻¹ de AIB.

Para a avaliação do efeito de aminoácidos precursores de glicosinolatos na cultura de raízes, foram utilizadas raízes com 30 dias de cultivo em meio MS + 3 mg.L⁻¹ AIB. As raízes foram transferidas para meio MS + 3 mg.L⁻¹ AIB suplementado com alanina, isoleucina, leucina, metionina, triptofano ou valina, na concentração 200 mg.L⁻¹.

O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da esterilização em autoclave a 121°C (1 atm), por 15 min. Em cada erlenmeyer (125 mL), vedado com tampa dupla

de folha de papel alumínio, contendo 25 mL de meio líquido, foram inoculados quatro explantes. Em cada tratamento foram realizadas cinco repetições, sendo cada frasco erlenmeyer uma repetição. Cada experimento foi repetido duas vezes.

As culturas foram mantidas nas condições anteriormente mencionadas.

Após 30 dias em cultura, foram avaliados o peso de matéria fresca e o peso de matéria seca das raízes, e calculado o acúmulo de biomassa.

5.3.6 Análise fitoquímica

A produção de glicosinolatos foi avaliada utilizando-se cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

5.3.6.1 Extração

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal/IBRAG.

O material vegetal foi triturado, adicionado de água destilada (5 mL/g) e mantido por 17-20 h sob agitação, em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), com velocidade constante de 110 rpm, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, em ausência de luz, para hidrólise. Após este tempo, realizou-se a filtração em papel de filtro Whatman Nº1, e em seguida, a partição com diclorometano P.A. numa relação de volume 1:1. A partição foi repetida por três vezes, sendo a fase aquosa descartada. A fase de diclorometano foi concentrada sob vácuo (evaporador rotativo Marconi®), a 25°C , e ressolubilizada em diclorometano grau HPLC (Vetec) a $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.3.6.2 Análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), do Departamento de Bioquímica (DBq/IBRAG).

Todos os extratos foram analisados por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu GCMS-QP2010 Plus com coluna Rtx® 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm RESTEK USA), com fluxo de 1,58 mL/min, divisão de fluxo de 10:0, e

hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 260°C, do detector de 290°C e da interface de 200°C.

A programação da temperatura empregada foi: temperatura inicial de 50°C por 3 min, com aumento até 290°C numa razão de 3°C/min; permaneceu a 290°C por 1 min, totalizando 84 min. Foram injetados 1 µL de cada amostra.

A faixa de varredura das razões massa/carga (m/z) foi de 40 a 500. A energia de ionização foi de 10 eV. A identificação das substâncias foi realizada por comparação do perfil de fragmentação dos espectros de massas obtidos com aqueles da biblioteca eletrônica do equipamento (NIST05.LIB) e do percentual de similaridade.

5.3.7 Análise estatística

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com cinco repetições, sendo cada bloco representado por uma repetição, contendo quatro explantes. Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.00.

5.4 Resultados

5.4.1 Cultura de raízes a partir de plântulas oriundas de germinação *in vitro*

Neste experimento, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações da composição salínica do meio MS e de diferentes auxinas sobre a proliferação de raízes, a partir de explantes radiculares de plântulas oriundas de germinação *in vitro*.

Os explantes radiculares inoculados em meio de cultura sem suplementação hormonal, em diferentes diluições da composição salínica do meio MS, apresentaram início de formação de raízes laterais, na primeira semana de cultivo. As raízes laterais surgiram diretamente, a partir dos explantes, sem indução de calogênese. Inicialmente, as raízes recém-formadas possuíam espessura menor que o explante inicial e coloração branca (Figura 22).

Após 30 dias, observou-se que conforme se aumentou a diluição da composição salínica do meio MS, as culturas de raízes apresentaram maior multiplicação (Tabela 14) (Figura 23). Os maiores valores de acúmulo de biomassa foram verificados em meio MS com $\frac{1}{4}$ da sua composição de sais (MS $\frac{1}{4}$), alcançando 68,70 vezes o peso de matéria fresca (PF) inicial e 137,50 vezes o peso de matéria seca (PS) inicial, diferindo significativamente dos demais (Tabela 14).

Figura 22 – Multiplicação *in vitro* de raízes de *Cleome dendroides* a partir de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, com uma semana de cultivo, em meio de cultura MS na composição salínica total, isento de reguladores de crescimento.



Nota: Barra = 1 cm.

Aos 30 dias de cultura, algumas raízes recém-formadas apresentavam-se um pouco mais espessas e com coloração bege-clara, principalmente, no meio MS¼ (Figura 23).

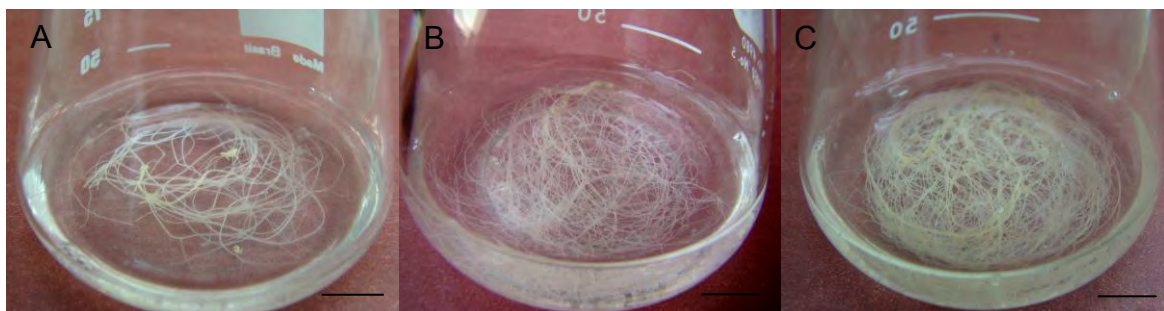
Tabela 14 - Efeito de diferentes concentrações da composição salínica do meio básico MS, sem fitorreguladores, sobre o crescimento de raízes de *Cleome dendroides* cultivadas *in vitro*, a partir de explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, após 30 dias em cultura.

Composição salínica do meio MS	Acúmulo de Biomassa	
	Matéria Fresca	Matéria Seca
MS0	30,18±12,84 ^b	29,33±10,97 ^b
MS ½	38,04±8,69 ^b	53,75±31,47 ^b
MS ¼	68,70±21,73 ^a	137,50±60,63 ^a

Legenda: Acúmulo de biomassa = razão entre o peso final e o peso inicial.

Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 23 – Multiplicação *in vitro* de raízes de *Cleome dendroides* a partir de explantes radiculares de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, com quatro semanas de cultivo, em meio MS isento de reguladores de crescimento, em diferentes composições salínicas.



Legenda: Composição salínica total (A); ½ da composição salínica - MS½ (B) e ¼ da composição salínica - MS¼ (C). Barras = 1cm.

Com o objetivo de aumentar a produção de biomassa, adicionaram-se ao meio MS diferentes fitorreguladores da classe das auxinas. Utilizaram-se cinco tipos auxinas, em quatro concentrações, conforme indicado na Tabela 15.

Tabela 15 - Efeito de diferentes auxinas sobre o crescimento de raízes de *Cleome dendroides* cultivadas *in vitro*, a partir de explantes radiculares de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, após 30 dias em cultura.

Regulador de crescimento	Concentração (mg.L ⁻¹)	Acúmulo de Biomassa	
		Matéria Fresca	Matéria Seca
MS0	-	30,18±12,84 ^c	29,41±10,95 ^c
ANA	0,5	38,30±12,84 ^c	32,67±4,76 ^c
	1,0	50,58±16,63 ^c	61,33±6,92 ^c
	2,0	50,93±5,27 ^c	58,00±20,46 ^c
	3,0	80,12±26,48 ^c	67,50±34,61 ^c
2,4-D	0,5	5,35±1,61 ^d	13,78±2,76 ^{cd}
	1,0	3,46±0,33 ^d	10,11±1,22 ^{cd}
	2,0	1,88±0,20 ^d	5,75±0,55 ^d
	3,0	2,32±0,64 ^d	7,80±2,12 ^d
AIA	0,5	4,82±1,36 ^d	7,50±1,78 ^d
	1,0	18,14±9,14 ^d	26,89±12,9 ^c
	2,0	39,03±4,55 ^c	53,50±14,04 ^c
	3,0	72,21±14,21 ^c	102,50±22,00 ^{bc}
AIB	0,5	100,07±9,22 ^b	150,00±13,65 ^b
	1,0	183,62±46,94 ^b	186,40±54,51 ^b
	2,0	196,47±57,52 ^b	225,67±50,99 ^b
	3,0	413,80±114,70 ^a	381,33±51,96 ^a
PIC	0,5	1,18±0,05 ^d	2,58±0,25 ^d
	1,0	1,35±0,01 ^d	2,50±0,39 ^d
	2,0	1,46±0,12 ^d	3,09±0,72 ^d
	3,0	3,53±0,51 ^d	9,33±1,16 ^{cd}

Legenda: Acúmulo de biomassa = razão entre o peso final e o peso inicial.

Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em todos os meios suplementados com fitorreguladores que apresentaram multiplicação de raízes, a formação das raízes laterais iniciou-se na primeira semana de cultivo. Nestes meios, a proliferação ocorreu por organogênese direta, não sendo observada calogênese. Em nenhum dos meios de cultura foi verificada regeneração de brotos.

Calogênese foi induzida em meios suplementados com diferentes concentrações de ácido 1-naftalenoacético (ANA), sem proliferação de raízes. Quanto maior a concentração de ANA, maior a produção de calo (Tabela 15). Os calos desenvolveram-se por todo explante, possuíam coloração branca e consistência friável, desprendendo, por vezes, pequenos aglomerados de células para o meio de cultura (Figura 24).

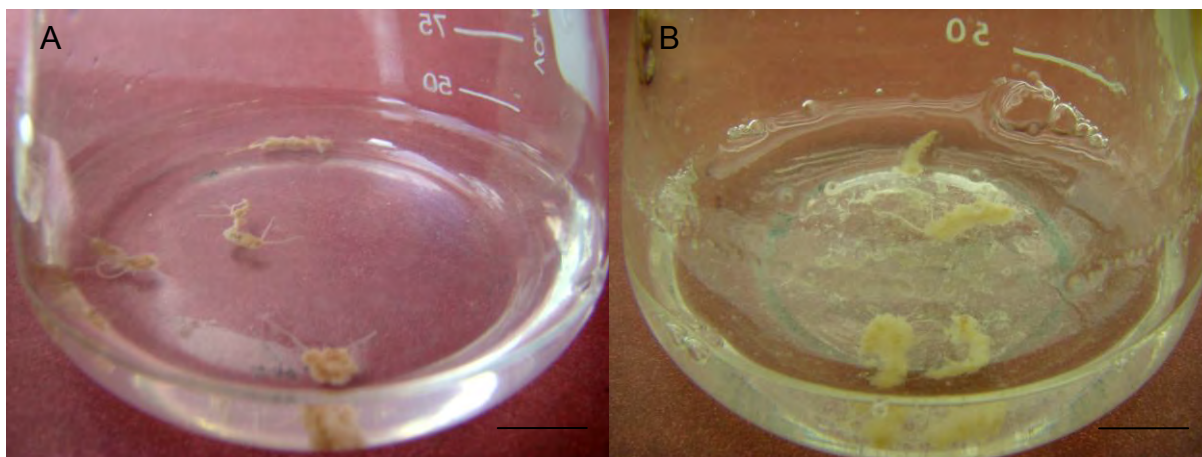
As auxinas picloram (PIC) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) não promoveram proliferação de raízes, nas diferentes concentrações testadas. Ambas inibiram a produção de raízes, quando comparadas ao meio MS0 (Tabela 15). Ocorreu a formação de poucas e pequenas raízes laterais que não se desenvolveram (Figura 25). Observando-se a Tabela 15, pode-se verificar que os menores acúmulos de biomassa foram obtidos nos meios suplementados com esses dois fitorreguladores.

O fitorregulador ácido 3-indolacético (AIA) promoveu multiplicação de raízes (Figura 26), porém o acúmulo de biomassa não foi superior ao observado no meio MS0 (Tabela 15). A maior proliferação de raízes ocorreu em meio com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA, obtendo-se 72,21 vezes o PF inicial e 102,50 vezes o PS inicial.

O ácido indolilbutírico (AIB) foi a auxina mais eficiente para o estabelecimento das culturas de raízes (Figura 27). A menor concentração testada ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) resultou em três vezes o acúmulo de biomassa fresca e cinco vezes o acúmulo de biomassa seca obtida pelo meio MS0 (Tabela 15). O aumento gradativo da concentração desse fitorregulador promoveu uma maior produção de biomassa, alcançando valores de 413,80 vezes o PF inicial e 381,33 vezes o PS inicial, no meio com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$, que diferiu estatisticamente de todos os demais tratamentos.

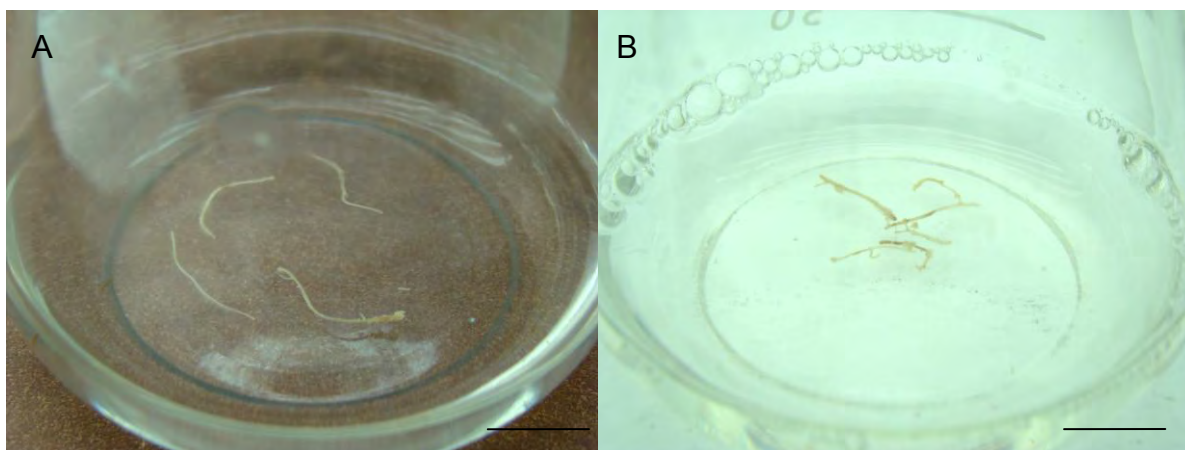
Em um experimento posterior, avaliou-se o efeito da combinação da melhor diluição do meio MS com a melhor auxina sobre o acúmulo de biomassa. Testou-se MS $\frac{1}{4}$ suplementado com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB. O resultado de acúmulo de biomassa da combinação MS $\frac{1}{4}$ + $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB diferiu significativamente do melhor resultado (MS + $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB) (Tabela 16). As raízes possuíam as mesmas características das demais culturas.

Figura 24 – Calogênese em explantes radiculares de *Cleome dendroides* provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, cultivados em meio MS com ANA, após quatro semanas de cultivo.



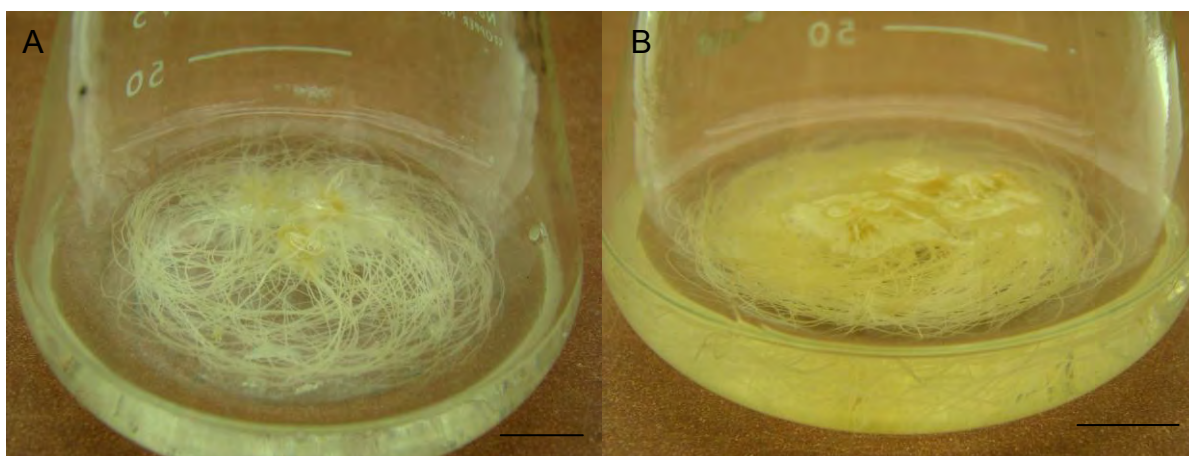
Legenda: A- 0,5 mg.L⁻¹ ANA; B- 1 mg.L⁻¹ ANA. Barras = 1 cm.

Figura 25 – Ausência de resposta morfogênica em explantes radiculares de *Cleome dendroides* provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, após quatro semanas, em meio suplementado com PIC ou 2,4-D.



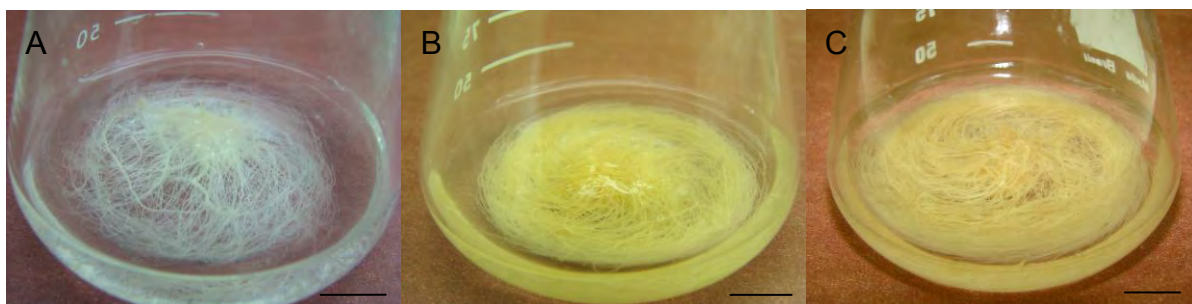
Legenda: Meio MS suplementado com: A- 1,0 mg.L⁻¹ PIC; B- 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D. Barras = 1 cm.

Figura 26 – Multiplicação *in vitro* de raízes de *Cleome dendroides* provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, com quatro semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com AIA.



Legenda: A- 2,0 mg.L⁻¹ AIA; B- 3,0 mg.L⁻¹ AIA. Barras = 1 cm.

Figura 27 – Multiplicação *in vitro* de raízes de *Cleome dendroides* provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, com quatro semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com AIB.



Legenda: A- 1,0 mg.L⁻¹ AIB; B- 2,0 mg.L⁻¹ AIB; C- 3,0 mg.L⁻¹ AIB. Barras = 1 cm.

Tabela 16 - Efeito de diferentes concentrações da composição salínica do meio básico MS suplementado com 3 mg.L⁻¹ AIB sobre o crescimento de raízes *in vitro* de *Cleome dendroides*, a partir de explantes radiculares de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, após 30 dias em cultura.

Composição salínica do meio MS	Regulador de crescimento (mg.L ⁻¹)	Acúmulo de Biomassa	
		Matéria Fresca	Matéria Seca
MS ¼	-	68,70±21,76 ^b	137,50±60,63 ^b
MS	AIB (3,0)	413,80±114,70 ^a	381,33±51,96 ^a
MS ¼	AIB (3,0)	102,22±6,69 ^b	217,50±22,22 ^b

Legenda: Acúmulo de biomassa = razão entre o peso final e o peso inicial.

Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.4.2 Cultura de raízes a partir de plantas mantidas em estoque *in vitro*

Neste experimento, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações da composição salínica do meio MS e de diferentes auxinas sobre a proliferação de raízes, a partir de explantes provenientes de plantas mantidas em estoque *in vitro*.

Os explantes inoculados nos meios de cultura MS0, MS½ e MS¼ apresentaram início de formação de raízes laterais, na primeira semana de cultivo. As raízes desenvolveram-se por organogênese direta. Elas possuíam as mesmas características das raízes provenientes de plantas germinadas sob condições *in vitro*.

Aos 30 dias de cultura, o aumento gradativo da diluição da composição salínica do meio MS promoveu uma maior multiplicação de raízes (Tabela 17). Os maiores valores de acúmulo de biomassa foram obtidos em meio MS¼, alcançando-se 22,97 vezes o PF inicial e 38,83 vezes o PS inicial.

Os mesmos fitorreguladores utilizados no experimento com plantas germinadas sob condições *in vitro*, nas mesmas concentrações, foram suplementados ao meio MS com o objetivo de aumentar a produção de biomassa (Tabela 18).

A auxina ANA induziu a formação de calos, nas diferentes concentrações testadas, sem promover a proliferação de raízes. As auxinas PIC e 2,4-D também não se mostraram eficientes para a multiplicação de raízes, produzindo baixo acúmulo de biomassa (Tabela 18).

Tabela 17 - Efeito de diferentes concentrações da composição salínica do meio básico MS, sem fitorreguladores, sobre o crescimento de raízes de *Cleome dendroides* cultivadas *in vitro* a partir de explantes radiculares provenientes de plantas mantidas *in vitro*, após 30 dias em cultura.

Composição salínica do meio MS	Acúmulo de Biomassa	
	Matéria Fresca	Matéria Seca
MS0	2,30±0,83 ^b	4,00±1,43 ^b
MS ½	12,84±5,90 ^a	21,67±9,34 ^a
MS ¼	22,97±6,85 ^a	38,83±9,98 ^a

Legenda: Acúmulo de biomassa = razão entre o peso final e o peso inicial.

Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os meios suplementados com os fitorreguladores AIA e AIB promoveram multiplicação de raízes, por organogênese direta, a partir da primeira semana de cultivo.

Tabela 18 - Efeito de diferentes auxinas sobre o crescimento de raízes de *Cleome dendroides* cultivadas *in vitro* a partir de explantes radiculares provenientes de plantas mantidas *in vitro*, após 30 dias em cultura.

Regulador de crescimento	Concentração (mg.L ⁻¹)	Acúmulo de Biomassa	
		Matéria Fresca	Matéria Seca
MS0	-	2,30±1,68 ^c	4,00±2,86 ^c
	0,5	2,43±0,84 ^c	6,83±2,11 ^c
ANA	1,0	1,98±0,53 ^c	7,50±1,15 ^c
	2,0	2,08±0,26 ^c	7,00±0,90 ^c
	3,0	7,18±4,58 ^c	15,67±7,41 ^c
	0,5	2,14±0,17 ^c	7,67±0,60 ^c
2,4-D	1,0	2,18±0,68 ^c	8,67±1,76 ^c
	2,0	1,70±0,23 ^c	8,00±0,73 ^c
	3,0	2,23±0,17 ^c	7,17±0,88 ^c
	0,5	70,04±23,92 ^b	93,17±31,74 ^b
AIA	1,0	56,64±13,10 ^b	82,33±19,34 ^b
	2,0	48,91±8,02 ^b	74,17±20,45 ^b
	3,0	39,92±6,10 ^b	60,50±8,73 ^b
	0,5	12,52±2,65 ^b	14,17±3,06 ^c
AIB	1,0	13,93±3,22 ^b	16,83±2,54 ^c
	2,0	43,25±16,63 ^b	59,50±26,23 ^b
	3,0	135,16±37,30 ^a	182,17±44,88 ^a
	0,5	2,49±0,45 ^c	6,67±0,84 ^c
PIC	1,0	2,82±0,57 ^c	8,00±1,46 ^c
	2,0	2,18±0,62 ^c	5,33±1,40 ^c
	3,0	3,84±0,60 ^c	10,00±1,32 ^c

Legenda: Acúmulo de biomassa = razão entre o peso final e o peso inicial.

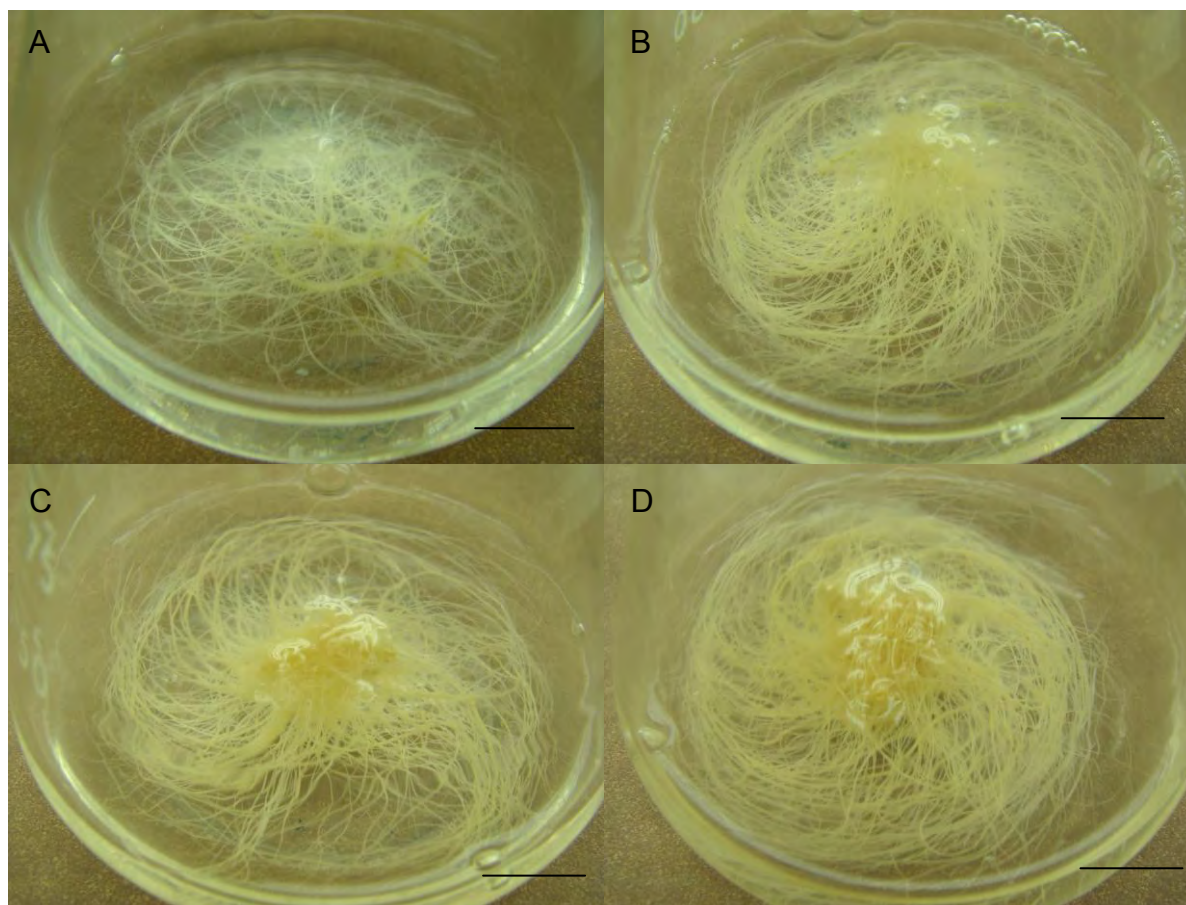
Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Aos 30 dias de cultivo, o aumento da concentração de AIA resultou na diminuição gradativa do acúmulo de biomassa, tanto em relação ao PF quanto ao PS. As culturas com maior proliferação de raízes foram obtidas em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA, com valores de acúmulo de biomassa fresca de 70,04 e de biomassa seca de 93,17 (Tabela 18).

A auxina AIB mostrou-se mais eficiente para a proliferação de raízes provenientes de plantas mantidas em estoque *in vitro* (Figura 28), assim como ocorreu com explantes provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*. O acúmulo de biomassa aumentou com a concentração do fitorregulador, atingindo maiores valores em $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB. Os resultados obtidos equivalem a 135,16 vezes o PF inicial e 182,17 vezes o PS inicial.

Em nenhum dos meios de cultura foi verificada regeneração de brotos.

Figura 28 – Multiplicação *in vitro* de raízes de *Cleome dendroides*, provenientes de plantas mantidas em estoque *in vitro*, com quatro semanas de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com AIB.



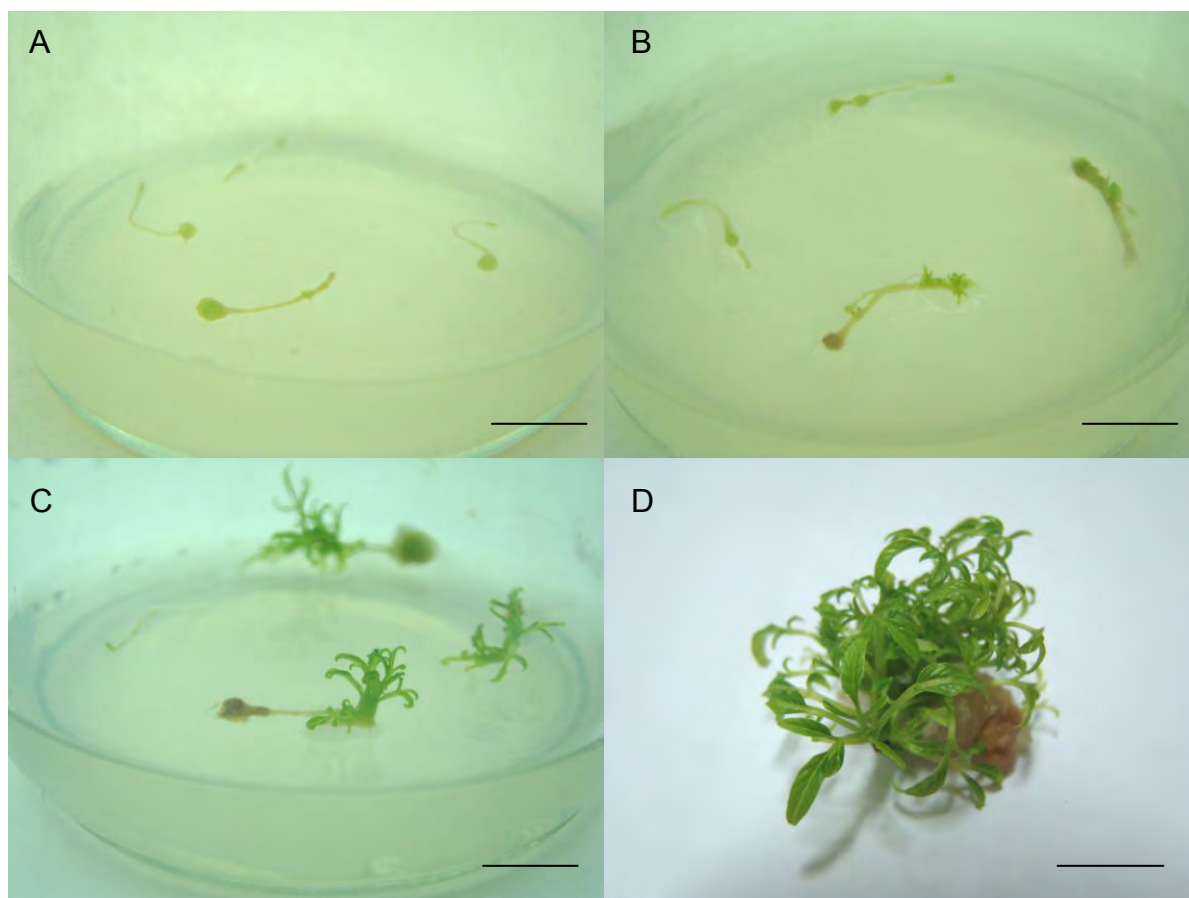
Legenda: A- $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB; B- $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB; C- $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB; D- $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB. Barras = 1 cm.

5.4.3 Regeneração de brotos

Neste experimento, avaliou-se a capacidade organogênica das raízes recém-formadas em culturas oriundas de plantas germinadas *in vitro*. Foram utilizadas como fonte de explantes culturas de raízes em meio MS + AIA (2,0; 3,0 mg.L⁻¹) ou MS + AIB (2,0; 3,0 mg.L⁻¹).

Em todos os meios suplementados com BA foi verificada regeneração de brotos. Após 10 dias em cultura, em uma das extremidades dos explantes radiculares ocorreu a indução de gemas, enquanto na outra extremidade, a indução de calos verdes (Figura 29A). Os calos apresentavam-se internamente consistentes e externamente pouco friáveis. A partir de 15 dias de cultura, os calos começaram a ganhar uma tonalidade amarronada e aparência mais friável (Figura 29B). Nesta fase, os brotos iniciaram seu desenvolvimento.

Figura 29 – Regeneração de brotos *in vitro* a partir de raízes recém-formadas de *Cleome dendroides*, em meio de cultura MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ BA.



Legenda: Cultura com 10 dias (A), 15 dias (B), 30 dias (C) e 60 dias (D). Barra = 1 cm.

Os brotos regenerados nos diferentes meios não possuíam comprimento igual ou superior a 0,5 cm aos 30 dias de cultura, desta forma, não foram individualizados quando do subcultivo (Figura 29C).

Após 60 dias de cultivo, os explantes provenientes de meios com 3,0 mg.L⁻¹ AIA apresentaram maior frequência de regeneração do que aqueles vindos de meios com 2,0 mg.L⁻¹ AIA, apesar de não diferir estatisticamente no número médio de brotos por explante (Tabela 19).

Tabela 19 - Regeneração de brotos de *Cleome dendroides* a partir de explantes radiculares recém-formados em culturas provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 60 dias de cultivo.

Meio de origem dos explantes (mg.L ⁻¹)	Meio de regeneração de brotos - BA (mg.L ⁻¹)	Frequência de regeneração (%)	Número médio de brotos por explante
AIA (2,0)	1,0	25,0±14,4 ^b	3,5±1,2 ^b
	2,0	25,0±14,4 ^b	4,0±1,4 ^b
	3,0	50,0±14,4 ^b	3,8±1,5 ^b
AIA (3,0)	1,0	83,3±8,3 ^a	2,4±0,3 ^b
	2,0	83,3±16,7 ^a	5,6±0,98 ^b
	3,0	75,0±8,3 ^a	5,6±1,4 ^b
AIB (2,0)	1,0	50,0±0,0 ^b	9,0±3,4 ^a
	2,0	100,0±0,0 ^a	7,7±1,8 ^a
	3,0	100,0±0,0 ^a	7,6±1,4 ^a
AIB (3,0)	1,0	100,0±0,0 ^a	9,7±1,7 ^a
	2,0	100,0±0,0 ^a	7,3±0,3 ^a
	3,0	100,0±0,0 ^a	7,7±1,8 ^a

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Explantes radiculares oriundos de meios suplementados com AIB apresentaram, em sua maioria, maior frequência de regeneração, apesar de não diferirem estatisticamente dos explantes vindos de 3 mg.L⁻¹ AIA (Tabela 19).

O número médio de brotos (NMB) regenerados a partir de explantes radiculares oriundos de meios suplementados com AIB (2 e 3 mg.L⁻¹) foi estatisticamente igual nas diferentes concentrações de BA. Entretanto, o maior valor

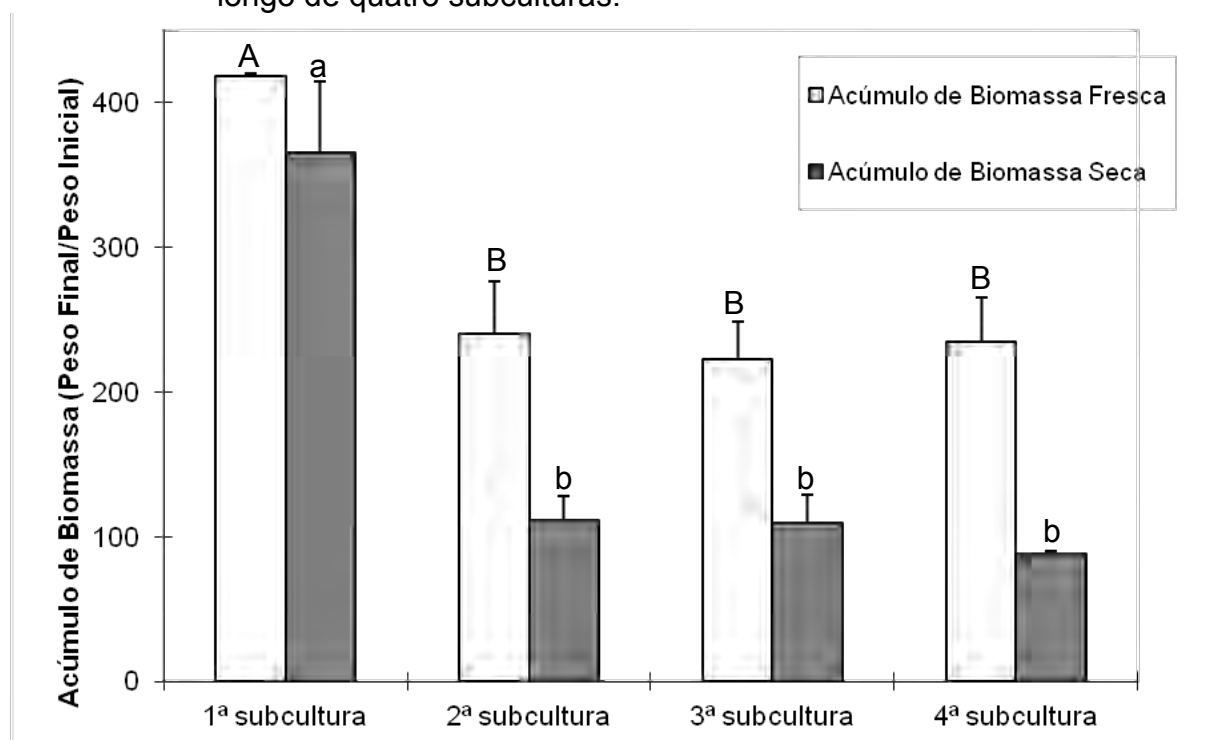
de NMB foi obtido em meio com 1 mg.L^{-1} BA, em explantes radiculares provenientes de culturas com 3 mg.L^{-1} de AIB (Tabela 19) (Figura 29D).

5.4.4 Manutenção da cultura de raízes e avaliação da capacidade regenerativa de brotos

Neste experimento, avaliou-se a capacidade de manutenção das culturas de raízes provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, por sucessivas subculturas. O meio de cultura MS suplementado com 3 mg.L^{-1} AIB foi utilizado.

Através da análise da Figura 30, verifica-se que após as raízes permanecerem um mês em cultura, foram obtidos acúmulos de biomassa da ordem de 400 vezes tanto para PF quanto para PS. Após a primeira subcultura, o acúmulo de biomassa relativo a ambos os parâmetros avaliados sofreu uma redução significativa. E a partir da segunda subcultura, o acúmulo de biomassa fresca estabilizou-se em torno de 250 vezes o PF inicial, enquanto o PS, 100 vezes o PS inicial.

Figura 30 – Acúmulo de biomassa em cultura de raízes de *Cleome dendroides* provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, em meio de cultura MS suplementado com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB, ao longo de quatro subculturas.



Legenda: Colunas de cada parâmetro com letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As raízes mantiveram as mesmas características durante as sucessivas subculturas, sem ocorrer calogênese, formação de brotos ou oxidação.

A cada subcultivo das culturas de raízes, explantes foram excisados e inoculados em meios suplementados com BA (1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹), com o objetivo de avaliar a manutenção da capacidade regenerativa de brotos.

As três concentrações hormonais testadas mostraram-se eficientes para a regeneração de brotos. Os explantes mantiveram a capacidade regenerativa ao longo das quatro subculturas, sem diferença significativa, exceto para o meio com 3,0 mg.L⁻¹ de BA, na quarta subcultura (Tabela 20).

Em todos os meios e em todas as subculturas, a regeneração ocorreu por organogênese direta. A exceção foi verificada na última subcultura, no meio com 3,0 mg.L⁻¹ BA, em que foi verificada regeneração tanto por organogênese direta, como indireta, além do desenvolvimento de brotos de aspecto hiperídrico.

O número médio de brotos por explante foi estatisticamente igual nas diferentes concentrações de BA, durante as quatro subculturas, exceto na terceira subcultura em meio com 3 mg.L⁻¹ BA. Porém, os maiores valores de produção de brotos, por organogênese direta, foram obtidos em meios com 1 mg.L⁻¹ BA, nas duas primeiras subculturas (Tabela 20).

Tabela 20 - Regeneração de brotos *in vitro* a partir de raízes recém-formadas de *Cleome dendroides*, em meio de cultura MS suplementado com 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ BA, ao longo de quatro subculturas.

Subcultura	Frequência Regenerativa (%)			Número médio de brotos por explante		
	1 mg.L ⁻¹ BA	2 mg.L ⁻¹ BA	3 mg.L ⁻¹ BA	1 mg.L ⁻¹ BA	2 mg.L ⁻¹ BA	3 mg.L ⁻¹ BA
1 ^a	100,0±0,0 ^a	91,7±8,3 ^a	75,0±25,00 ^{ab}	11,0±1,7 ^a	7,3±2,0 ^{ab}	6,1±0,4 ^{ab}
2 ^a	100,0±0,0 ^a	75,0±14,4 ^{ab}	75,0±25,0 ^{ab}	10,7±3,8 ^a	5,7±1,4 ^{ab}	6,3±4,4 ^{ab}
3 ^a	75,0±14,4 ^{ab}	75,0±14,4 ^{ab}	75,0±25,0 ^{ab}	7,3±4,4 ^{ab}	5,3±2,3 ^{ab}	4,0±1,1 ^b
4 ^a	75,0±14,4 ^{ab}	91,7±8,3 ^a	50,0±15,0 ^b	7,0±2,5 ^{ab}	8,0±4,1 ^{ab}	13,0±1,2 ^{a+}

Legenda: + Regeneração de brotos via organogênese indireta e desenvolvimento de brotos hiperídricos.
Médias ± erro padrão nas colunas referentes a cada parâmetro avaliado seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

5.4.5 Adição de elicitores e precursores na cultura de raízes

Neste experimento, um dos objetivos foi avaliar o efeito da adição de elicitores sobre a proliferação de raízes, a partir de explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*. Após 30 dias em cultura, observou-se a proliferação de raízes em todos os meios testados, independente da suplementação.

Os meios suplementados com extrato de levedura, metiljasmonato e quitosana promoveram maior proliferação de raízes, não apresentando diferença significativa quanto ao acúmulo de biomassa fresca, inclusive em relação ao controle. Quanto ao acúmulo de biomassa seca, metiljasmonato e a menor concentração de extrato de levedura apresentaram os melhores resultados, diferindo significativamente dos demais tratamentos, com destaque ao metiljasmonato, na concentração de 0,125 mg.L⁻¹, que promoveu um aumento de 506,40 vezes do PF inicial e 804,80 vezes do PS inicial (Tabela 21).

As culturas apresentavam as mesmas características que o controle, como raízes de coloração bege clara (Figura 31).

Tabela 21 - Efeito de diferentes elicitores sobre o crescimento de raízes de *Cleome dendroides* cultivadas *in vitro* a partir de explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 30 dias em cultura.

Elicitor	Concentração (mg.L ⁻¹)	Acúmulo de Biomassa	
		Matéria Fresca	Matéria Seca
Controle	-	362,90±67,31 ^{ab}	381,90±71,60 ^b
Ácido salicílico	0,125	136,00±30,86 ^b	139,10±31,66 ^{bc}
	0,250	65,63±25,63 ^c	79,50±27,46 ^c
Extrato de levedura	1,25	281,10±72,33 ^{ab}	522,50±134,50 ^{ab}
	2,50	385,60±76,94 ^{ab}	389,20±71,23 ^b
Metiljasmonato	0,125	506,40±56,66 ^a	804,80±90,04 ^a
	0,250	329,40±46,66 ^{ab}	597,10±71,97 ^{ab}
Quitossana	1,25	242,30±58,60 ^{ab}	389,80±94,28 ^b
	2,50	238,50±64,62 ^{ab}	388,00±102,40 ^b

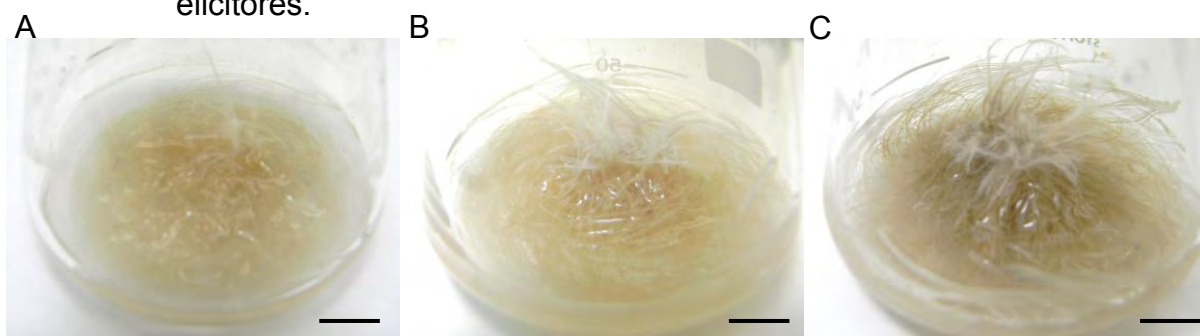
Legenda: Meio de cultivo: Meio MS + 3 mg.L⁻¹ AIB.

Acúmulo de biomassa = razão entre o peso final e o peso inicial.

Médias± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

O ácido salicílico inibiu a proliferação de raízes, uma vez que na maior concentração ($0,250 \text{ mg.L}^{-1}$) apresentou valores de acúmulo de biomassa fresca e seca menores que o controle (Tabela 21).

Figura 31 - Multiplicação *in vitro* de raízes de *Cleome dendroides* provenientes de plântulas oriundas de germinação sob condições *in vitro*, após 30 dias de cultivo, em meio de cultura MS suplementado com 3 mg.L^{-1} AIB e elicitores.



Legenda: A - meio controle; B - meio suplementado com $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de extrato de levedura; C - meio suplementado com $0,125 \text{ mg.L}^{-1}$ de metiljasmonato. Barra = 1 cm.

Neste experimento, outro objetivo foi avaliar o efeito da adição de precursores sobre a proliferação de raízes, a partir de explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*.

Após 30 dias em cultura, observou-se proliferação de raízes em todos os meios, sem diferença significativa no PF e no PS (Tabela 22), demonstrando que os aminoácidos não influenciaram o acúmulo de biomassa.

As culturas suplementadas com os diferentes precursores apresentaram as mesmas características do controle, como raízes bege-claras.

Tabela 22 - Efeito de diferentes precursores (200 mg.L⁻¹) sobre o crescimento de raízes de *Cleome dendroides* cultivadas *in vitro*, a partir de explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 30 dias em cultura.

Aminoácido precursor	Acúmulo de Biomassa	
	Matéria Fresca	Matéria Seca
Controle	884,50±200,90 ^a	1160,00±227,80 ^a
Alanina	752,70±12,88 ^a	1212,00±63,52 ^a
Isoleucina	812,60±39,73 ^a	1414,00±89,76 ^a
Leucina	893,30±135,50 ^a	1167,00±87,48 ^a
Metionina	753,90±225,60 ^a	1093,00±247,00 ^a
Triptofano	827,20±150,80 ^a	1351,00±245,20 ^a
Valina	457,80±134,70 ^a	801,90±229,10 ^a

Legenda: Meio de cultivo: Meio MS + 3 mg.L⁻¹ AIB.

Acúmulo de biomassa = razão entre o peso final e o peso inicial.

Médias± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

5.4.6 Análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A Tabela 23 indica o rendimento da extração por partição com diclorometano das diferentes culturas de raízes que foram analisados por CG- EM.

A análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas indicou a presença de um derivado de glicosinolato (indicado como substância 1) em todas as amostras (Figuras 32 e 33).

A substância 1 apresentou-se em baixa porcentagem de concentração (<50%) nos diferentes extratos, destacando-se apenas as culturas de raízes suplementadas com alanina (Figura 33B; 29,07%), isoleucina (Figura 33C; 44,60%) e triptofano (Figura 33F; 26,36%) (Tabela 24).

Tabela 23 - Rendimento (%) da extração por partição com diclorometano das culturas de raízes de *Cleome dendroides*.

Material Vegetal	Peso de Matéria Fresca (g)	Resíduo (g)	Rendimento (%)
Cultura de raízes - controle	3,00	0,0009	0,0300
Cultura + ácido salicílico 0,125 mg.L ⁻¹	3,00	0,0010	0,0330
Cultura + ácido salicílico 0,250 mg.L ⁻¹	3,00	0,0013	0,0430
Cultura + extrato de levedura 1,25 mg.L ⁻¹	3,00	0,0012	0,0400
Cultura + extrato de levedura 2,50 mg.L ⁻¹	3,00	0,0015	0,0500
Cultura + metiljasmonato 0,125 mg.L ⁻¹	3,00	0,0016	0,0530
Cultura + metiljasmonato 0,250 mg.L ⁻¹	3,00	0,0028	0,0930
Cultura + quitosana 1,25 mg.L ⁻¹	3,00	0,0020	0,0660
Cultura + quitosana 2,50 mg.L ⁻¹	3,00	0,0015	0,0500
Cultura + alanina 200 mg.L ⁻¹	3,00	0,0010	0,0330
Cultura + isoleucina 200 mg.L ⁻¹	3,00	0,0090	0,3000
Cultura + leucina 200 mg.L ⁻¹	3,00	0,0028	0,0930
Cultura + metionina 200 mg.L ⁻¹	3,00	0,0014	0,0470
Cultura + triptofano 200 mg.L ⁻¹	3,00	0,0007	0,0230
Cultura + valina 200 mg.L ⁻¹	3,00	0,0008	0,0270

Figura 32 - Cromatogramas obtidos por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos de culturas *in vitro* de raízes de *Cleome dendroides* adicionadas de elicitores.

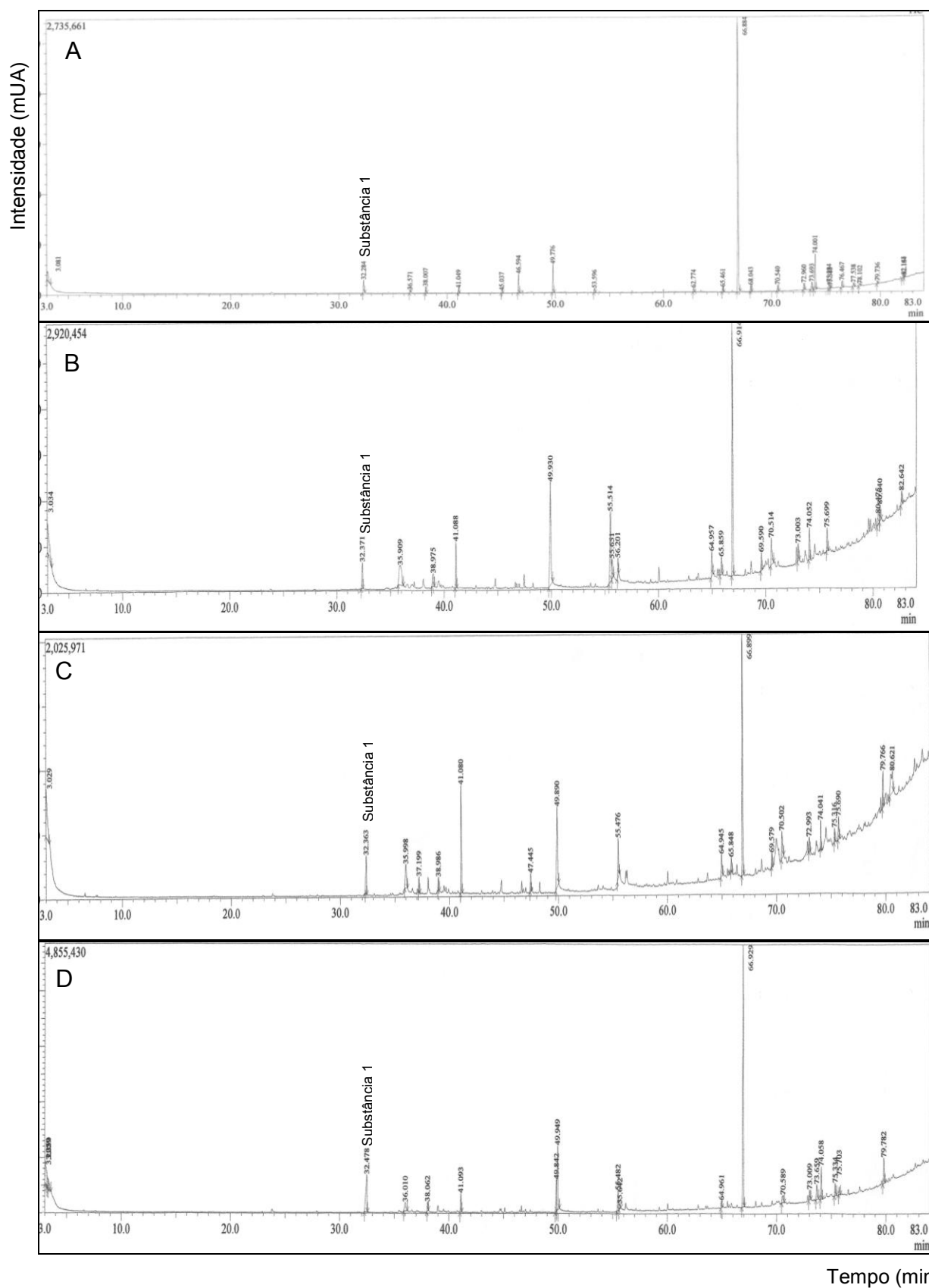
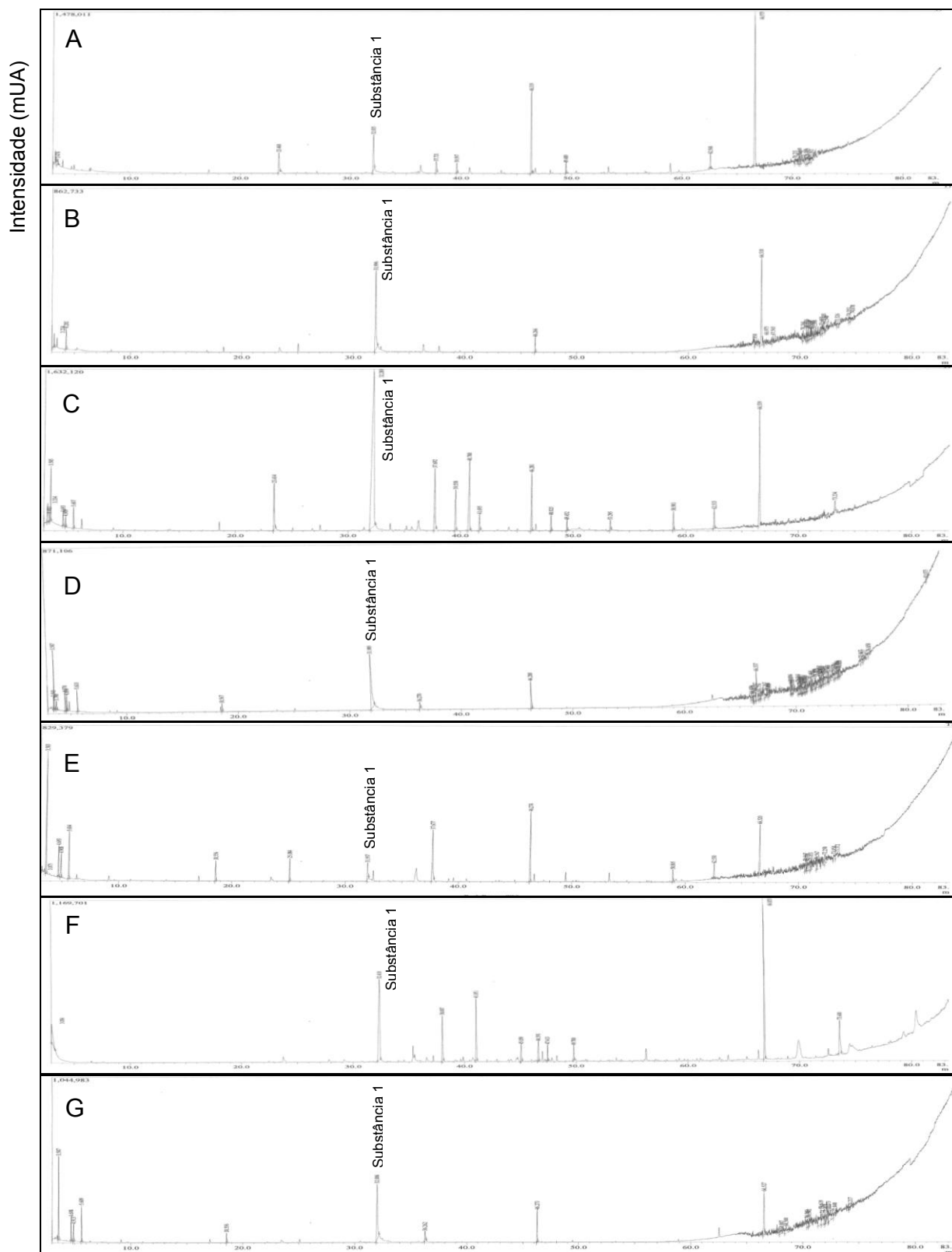


Figura 33 - Cromatogramas obtidos por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de extratos de culturas *in vitro* de raízes de *Cleome dendroides* adicionadas de aminoácidos precursores de glicosinolatos (200 mg.L⁻¹).



Legenda: A - controle; B - alanina; C - isoleucina; D - leucina; E - metionina; F - triptofano; G - valina.

Tempo (min)

Analisando-se o extrato de cultura de raízes suplementadas com isoleucina, o espectro de massas da substância com tempo de retenção 32,280 min (Figura 33C) mostrou picos de m/z (intensidade relativa): 147 (M^+ , 100%), 132 (22,72%), 118 (82,10%), 104 (17,74%), 91 (27,34%), 77 (14,35%), 58 (9,06%), 51 (7,26%), 40 (0,81%). Os dados indicam que a substância tem peso molecular 147 e fórmula molecular C_9H_9NO . Todos os espectros de massa onde esta substância foi detectada apresentaram índices de similaridade iguais ou superiores a 88% quando comparados aos existentes na base de dados do equipamento (NIST05.LIB). Esta substância foi identificada como 2,6-dimetilfenil isocianato, CAS 28556-81-2.

Tabela 24 - Tempo de retenção e concentração em porcentagem do derivado de glicosinolato presente nas culturas de raízes de *Cleome dendroides*.

Material Vegetal	Tr1	Conc.1 (%)
Cultura de raízes - controle	32,28	2,88
Cultura de raízes - extrato de levedura 1,25 mg.L ⁻¹	32,37	2,79
Cultura de raízes - metiljasmonato 0,125 mg.L ⁻¹	32,36	4,39
Cultura de raízes - quitosana 1,25 mg.L ⁻¹	32,48	9,03
Cultura de raízes - controle de aminoácidos	32,04	10,36
Cultura de raízes - alanina 200 mg.L ⁻¹	31,99	29,07
Cultura de raízes - isoleucina 200 mg.L ⁻¹	32,28	44,60
Cultura de raízes - leucina 200 mg.L ⁻¹	31,99	15,52
Cultura de raízes - metionina 200 mg.L ⁻¹	31,96	3,90
Cultura de raízes - triptofano 200 mg.L ⁻¹	32,41	26,36
Cultura de raízes - valina 200 mg.L ⁻¹	32,01	18,13

Legenda: Tr: Tempo de retenção; Conc.: Concentração em %; 1 - relativo à substância 1.

5.5 Discussão

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que foi alcançado, com sucesso, o estabelecimento das culturas de raízes de *Cleome dendroides*. Os protocolos foram eficientes, permitindo uma grande produção de biomassa, podendo atender a diversas demandas.

As culturas de raízes, geralmente, são estabelecidas em meio líquido, uma vez que o crescimento em meio sólido ou em suporte sólido é mais lento, possivelmente, pelo fato de o meio líquido proporcionar maior aeração e disponibilidade de nutrientes (GEORGE et al., 2008). O meio líquido também apresenta outras vantagens, como, preparo menos complexo e menor custo devido a ausência de agar ou gelrite, agentes gelificantes caros e muito relacionados a problemas de impurezas (ADELBERG, 2004; GEORGE et al., 2008). Além disso, permite a extrapolação para o estabelecimento de cultura de raízes em larga escala, em sistemas de biorreatores (TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA; CID, 2010).

Diferentes meios básicos têm sido utilizados para a produção de raízes (HAQUE, et al., 1997; VAARIO et al., 1995; ZHANG, et al., 2013; ZOBAYED; SAXENA, 2003). Porém, optou-se pelo meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), uma vez que já haviam sido obtidas respostas promissoras com a propagação *in vitro* da espécie (Item 4; 4.4 - Resultados).

O meio de cultura para a produção de raízes não transformadas é, geralmente, suplementado com fitorreguladores (GEORGE et al., 2008), porém, as culturas de *C. dendroides* cresceram mesmo na ausência destes. Resultado similar foi obtido com outra espécie do gênero, *C. rosea*, quando se inoculou explantes radiculares provenientes de plantas axênicas em meio MS0 (CORDEIRO et al., 2015; SIMÕES et al., 2009a). Multiplicação de raízes em meio líquido sem fitorreguladores, ainda que com baixo rendimento, também foi observada em outras espécies, como, *Cicer arietinum* (ISLAM et al., 2005) e *Withania coagulans* (ABOUZID et al., 2010). Entretanto, a ausência de reguladores de crescimento não promoveu multiplicação de raízes em *Hypericum perforatum* (CUI et al., 2010) e *Plumbago zeylanica* (SIVANESAN; JEONG, 2009).

Segundo George e colaboradores (2008), o crescimento e a ramificação das raízes são afetados pela concentração mineral do meio. Conforme o autor, os micro e macroelementos possuem papel de sinalizadores, alterando os padrões de

desenvolvimento, fato ainda mais evidenciado nas raízes, cuja principal função é a captação de íons. Ainda, de acordo com o autor, o balanço de nitrogênio (íons amônio e nitrato), assim como a quantidade de nitrogênio total afeta a atividade enzimática, geralmente inibindo-a em alta concentração. Uma vez que a concentração total de nitrogênio, bem como de outros nutrientes, no meio MS é mais elevada que na maioria dos demais meios básicos (GEORGE et al., 2008), muitas vezes, é necessário reduzir o suprimento de sais do meio. Levando-se em consideração que a concentração de nutrientes representa um fator importante para o estabelecimento das culturas de raízes uma vez que as exigências nutricionais são particularidades de cada espécie, foram testadas diferentes diluições do meio básico MS (MS, MS $\frac{1}{2}$ e MS $\frac{1}{4}$) em nossos experimentos.

Conforme houve a diluição da composição salínica do meio MS, as culturas de raízes de *C. dendroides* apresentaram maior multiplicação, sendo observados os melhores valores de acúmulo de biomassa em meio MS $\frac{1}{4}$. Estes resultados estão de acordo com os obtidos com *Hypericum perforatum* (CUI et al., 2010), em que os meios mais diluídos promoveram maiores acúmulos de biomassa e produção de substâncias de interesse. A diluição do meio básico também foi mais eficiente para a produção de raízes de *Podophyllum peltatum* (ANBAZHAGAN et al., 2008), *Arnebia hispidissima* (SHEKHAWAT, 2012) e *Cicer arietinum* (ISLAM et al., 2005). Entretanto, para *Boerhaavia diffusa*, a maior produção de biomassa ocorreu em meio com a composição salínica total do meio MS, quando comparado ao meio MS $\frac{1}{2}$ (JENIFER et al., 2012).

Apesar do resultado positivo obtido em meios sem suplementação de fitorreguladores, optou-se por adicioná-los ao meio de cultura, com o objetivo de aumentar a multiplicação de raízes. Dentre os reguladores de crescimento mais empregados em cultura de raízes estão as auxinas (GEORGE et al., 2008; LEMOS, 2010). Considerando-se este fato, no presente trabalho, foram avaliadas diferentes concentrações das seguintes auxinas: AIA, ANA, AIB, PIC e 2,4-D.

As auxinas PIC e 2,4-D não foram eficientes na produção de biomassa. O uso de ANA induziu a calogênese, sem promover a multiplicação de raízes. Resultado similar foi obtido com *Cicer arietinum* (ISLAM et al., 2005), quando foram testadas diferentes concentrações de ANA e 2,4-D isoladamente, resultando em calogênese ao invés da indução de raízes. Calogênese também foi observada em explantes radiculares de *Cichorium intybus*, quando cultivados em meio suplementado com

ANA de forma isolada (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007). Entretanto, este fitorregulador promoveu o melhor resultado na proliferação de raízes de *Eurycoma longifolia* (HUSSEIN et al., 2012) e de *Boerhaavia diffusa* (JENIFER et al., 2012). Resultados positivos também foram alcançados com ANA em cultura de raízes de *Cleome rosea* (CORDEIRO et al., 2015; SIMÕES et al., 2009a). Cordeiro e colaboradores (2015) avaliaram o efeito de diferentes auxinas (ANA, AIB, AIA, 2,4-D) e citocinina (cinetina) sobre a proliferação de raízes desta espécie, tendo verificado que a menor concentração de ANA ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) foi a mais eficiente.

O fitorregulador AIA promoveu a multiplicação de raízes de *C. dendroides*, porém o acúmulo de biomassa não foi significativamente diferente do meio MS0, em todas as concentrações avaliadas. Em contraste, para *Hypericum perforatum* (CUI et al., 2010; GOEL et al., 2009; ZOBAYED; SAXENA, 2003) e para *Costus igneus* (NAGARAJAN et al., 2011) AIA mostrou-se eficiente na proliferação de raízes.

O ácido indolilbutírico (AIB) foi a auxina que influenciou significativamente no estabelecimento das culturas de raízes. A maior produção de biomassa ocorreu no meio com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, que diferiu estatisticamente de todos os demais tratamentos. Esta auxina também foi eficiente na produção de biomassa de *Hypericum perforatum* (CUI et al., 2010; ZOBAYED; SAXENA, 2003), *Podophyllum peltatum* (ANBAZHAGAN et al., 2008), *Betula platyphylla* (VAARIO et al., 1995), *Vernonia amygdalina* (KHALAFALLA et al., 2009), *Arnebia hispidissima* (SHEKHAWAT, 2012), *Costus igneus* (NAGARAJAN et al., 2011) e *Withania coagulans* (ABOUZID et al., 2010). Entretanto, para a multiplicação de raízes de *Psammosilene tunicoides* houve a necessidade de adição da combinação das auxinas AIB e ANA (ZHANG et al., 2013), fato também reportado para *Cicer arietinum*, em que foram necessárias as combinações de AIB + AIA ou AIB + ANA (ISLAM et al., 2005).

A origem dos explantes radiculares, de plântulas provenientes de germinação *in vitro* e de plantas mantidas em estoque *in vitro*, teve influência significativa no acúmulo de biomassa, tendo as plântulas fornecido explantes mais responsivos.

Segundo Lemos (2010), a indução de raízes laterais e adventícias tem ocorrido, na maioria das vezes, por adição das auxinas AIA ou AIB. Porém, AIB parece ser a mais eficaz, tanto na indução de raízes adventícias em estacas, como em explantes *in vitro*. De acordo com Epstein e Ludwig-Müller (1993), as diferenças existentes entre as várias auxinas estão relacionadas à natureza da substância (a

afinidade da auxina pelo receptor envolvido no enraizamento) e à concentração da auxina livre que alcança a célula-alvo, sendo que esta última depende de vários fatores: absorção, transporte, biotransformação e concentração de auxina endógena. Ainda, segundo os autores, a biotransformação ocorre por oxidação e conjugação. O AIA sofre oxidação, uma inativação irreversível, em maior extensão que o AIB, enquanto ANA não é oxidado. As três auxinas sofrem conjugação, uma inativação reversível, podendo ser liberadas dos seus conjugados em sua forma livre nos tecidos vegetais. Os autores afirmam que a maior habilidade do AIB em promover a produção de raízes, comparando-se ao AIA, tem sido atribuída à sua maior estabilidade em solução e a maior estabilidade dos seus conjugados nos tecidos vegetais.

Diferentes tipos de explantes podem ser utilizados para dar início às culturas de raízes. Para *C. dendroides* optou-se por explantes radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro* e plantas mantidas *in vitro*. Também foram utilizados explantes de raízes para cultura de *Cleome rosea* (CORDEIRO et al., 2015; SIMÕES et al., 2009a), *Raphanus sativus* (BETSUI et al., 2004) e *Cicer arietinum* (ISLAM et al., 2005).

Para outras espécies, culturas foram iniciadas a partir de explantes foliares, como no caso de *Eurycoma longifolia* (HUSSEIN et al., 2012), *Cichorium intybus* (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007) e *Taverniera cuneifolia* (JAMDHADE-VIJAY et al., 2012); a partir de explantes caulinares, como *Cichorium intybus* (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007) e *Hypericum perforatum* (ZOBAYED; SAXENA, 2003); e, inclusive, a partir de calos, como *Centella asiática* (MERCY et al., 2012) e *Hypericum perforatum* (GOEL et al., 2009). Porém, a organogênese indireta, a qual passa pela formação de calos, não é desejável, uma vez que pode induzir variação somaclonal, não ocorrendo manutenção do genótipo selecionado (CID, 2010; GEORGE et al., 2008).

George e colaboradores (2008) classificam as plantas em três categorias quanto à facilidade de cultivo de suas raízes *in vitro*. Da primeira classe participam espécies que permitem o cultivo das raízes por períodos de tempo indefinidos, com subculturas regulares. A segunda classe, representada por espécies lenhosas, apresenta recalcitrância no estabelecimento de culturas de raízes isoladas. E outras espécies, constituindo uma terceira classe, podem ser cultivadas por longos períodos, mas seu crescimento é bastante reduzido, conforme o tempo em cultura. Esta incapacidade de manutenção, segundo os autores, deve-se a uma indução de

dormência meristemática provocada pelo acúmulo de auxinas no ápice radicular ao longo do tempo de cultivo *in vitro*. Porém, a manipulação do meio de cultivo pode promover a retomada do crescimento da cultura.

Conforme observado nos experimentos de manutenção das culturas de raízes de *C. dendroides*, a espécie manteve a capacidade morfogênica durante um período prolongado, apesar de um ligeiro declínio. Obteve-se uma produção de biomassa contínua, sem haver necessidade de modificação das condições de cultivo.

Nos experimentos de avaliação da capacidade de regeneração de brotos a partir das raízes recém-formadas, foi observada resposta em todos os meios testados. Este resultado já havia sido verificado nos experimentos de propagação *in vitro* (Item 4; 4.4.1.3 e 4.4.2,3), onde o fitorregulador BA mostrou-se eficiente na regeneração de brotos a partir de explantes radiculares provenientes de diferentes origens.

A capacidade regenerativa de brotos a partir de raízes recém-formadas foi também avaliada na espécie *Hypericum perforatum* por Zobayed e Saxena (2003), que verificaram regeneração em meios suplementados com TDZ (thidiazuron). Entretanto, Goel e colaboradores (2009), em estudo posterior com a mesma espécie, não obtiveram regeneração em meio com TDZ e BA, somente com cinetina. Para *Betula platyphylla*, foi a combinação de ANA com BA que promoveu regeneração de brotos a partir de raízes recém-formadas (VAARIO et al., 1995)

A indução de gemas em *C. dendroides* sempre ocorreu em uma das extremidades do explante, enquanto na outra extremidade era verificada produção de calos. Esta influência da polaridade também foi observada em *Hypericum perforatum* (GOEL et al., 2009), quando explantes radiculares apresentaram indução de gemas apenas na extremidade proximal. Segundo George e colaboradores (2008), em explantes radiculares, via de regra, os brotos desenvolvem-se na extremidade proximal, enquanto novas raízes são produzidas na extremidade distal.

Pelas análises fitoquímicas, foi identificado em todas as culturas de raízes o derivado de glicosinolato 2,6-dimetilfenil isocianato, porém em baixas porcentagens. Desta forma, com o objetivo de estimular a produção, foram adicionados elicitores ou precursores (aminoácidos) aos meios de cultura.

Elicitação é um processo de indução ou otimização da síntese de metabólitos especiais pelas plantas de modo a garantir sua sobrevivência e competitividade (NAMDEO, 2007; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002). Porém, além da

síntese de metabólitos, os elicitores podem influenciar a produção de biomassa. No presente trabalho, foi possível verificar que os elicitores influenciaram a proliferação de raízes. O extrato de levedura e o metiljasmonato induziram uma maior produção de biomassa seca quando comparados com a cultura controle. Esses dois elicitores têm promovido o aumento da biomassa, além de influenciar a produção de metabólitos em culturas de *Ocimum sanctum* (HAKKIM et al., 2011; MATHEW; SANKAR, 2012), *Fagopyrum tataricum* (ZHAO et al., 2014), *Silybum marianum* (HASANLOO et al., 2009) e *Stemona sp.*(CHAICHANA et al., 2012). Há relatos do uso do extrato de levedura como suplemento com objetivo de aumento de biomassa devido ao seu alto teor de aminoácidos (GEORGE et al., 2008). Apesar do resultado positivo obtido no presente trabalho, vários trabalhos indicam o decréscimo no acúmulo de biomassa quando metiljasmonato é adicionado a diferentes tipos de culturas (CHAICHANA; DHEERANUPATTANA, 2012; KRZYZANOWSKA et al., 2012; SHABANI et al., 2009; SKRZYPCZAK-PIETRASZEK et al., 2014; WAWROSCH et al., 2014).

O estímulo para produção de metabólitos secundários desencadeado por elicitores depende de uma interação complexa entre o elicitor e seu sítio específico na célula vegetal, da linhagem celular, da fase de crescimento da cultura, das condições ambientais e do tempo de contato entre o elicitor e a cultura. Adicionalmente, a concentração do elicitor afeta a intensidade de resposta, que varia de acordo com a espécie vegetal (SIMÕES et al., 2012; SMETANSKA, 2008).

A adição dos elicitores (ácido salicílico, extrato de levedura, metiljasmonato e quitosana) às culturas de raízes não estimularam a produção de glicosinolatos. O derivado 5,6-dimetiltetrahydro-1,3-oxazina-2-tiona, produzido em raízes *in vivo* (Item 3), não foi produzido e o derivado 2,6-dimetilfenil isocianato não teve sua concentração aumentada em relação ao controle.

A adição de precursores é outra alternativa para estimular as vias biossintéticas de metabólitos de interesse. O conceito de adição de precursores baseia-se na idéia de que o fornecimento de substâncias intermediárias da via biossintética possa aumentar o rendimento do produto final (SMETANSKA, 2008).

Em *C. chelidonii*, foram utilizados os aminoácidos cisteína e metionina como precursores, que estimularam a produção do derivado metil isotiocianato em cultura de calos e de células em suspensão (SONGSAK; LOCKWOOD, 2004).

No presente trabalho, em relação ao acúmulo de biomassa, os precursores não afetaram significativamente as culturas de raízes. Em relação à produção de metabólitos, o derivado 2,6-dimetilfenil isocianato continuou sendo produzido em baixas porcentagens, independentemente do tipo de precursor utilizado, aminoácido alifático ou aminoácido indólico (triptofano), com destaque apenas às culturas de raízes suplementadas com isoleucina, onde se caracterizou como substância majoritária (44,60%). Acredita-se que, uma vez que este derivado apresenta um grupamento fenil em sua molécula, o uso de um aminoácido aromático (fenilalanina ou tirosina) possa otimizar sua produção em cultura.

Definiu-se uma metodologia eficiente para o estabelecimento e a manutenção de culturas de raízes produtoras de glicosinolato, bem como para a regeneração de brotos a partir das raízes recém-formadas de *C. dendroides*.

5.6 Conclusões

- ❖ O uso de explantes radiculares foi eficiente na produção de raízes por organogênese direta, em meio de cultura líquido sem suplementação hormonal, em diferentes diluições da composição salínica do meio MS, destacando-se a diluição MS^{1/4};
- ❖ A origem dos explantes radiculares, de plântulas provenientes de germinação *in vitro* e de plantas propagadas *in vitro*, teve influência significativa, assim como o fitorregulador AIB suplementado ao meio de cultura;
- ❖ A citocinina BA mostrou-se eficiente na regeneração de brotos a partir de raízes recém-formadas, por organogênese direta;
- ❖ Os protocolos definidos permitiram a manutenção da capacidade morfogênica durante quatro sucessivas subculturas, apesar de um ligeiro declínio na produção de biomassa;
- ❖ O uso de precursores de glicosinolatos ou elicitores não afetou a produção de biomassa em cultura de raízes, exceto quando foi utilizado metiljasmonato na concentração 0,125 mg.L⁻¹;
- ❖ A presença do derivado de glicosinolato 2,6-dimetilfenil isocianato foi verificada em todos os extratos de culturas de raízes, inclusive as adicionadas de elicitores ou precursores.

6 Estabelecimento de cultura de calos e de células em suspensão visando a análises fitoquímicas de *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f.

6.1 Introdução

A cultura de tecidos vegetais caracteriza-se pelo cultivo de células, tecidos ou órgãos de plantas, em meio nutritivo, sob condições controladas, sem influência de fatores ambientais e sazonais. Ela constitui uma importante ferramenta biotecnológica que possui inúmeras aplicações. O emprego da cultura de tecidos vegetais disponibiliza uma maior quantidade de material vegetal de espécies já comprovadamente produtoras de substâncias bioativas, além viabilizar métodos aplicados à conservação e ao uso sustentável da biodiversidade (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002). Possibilita, ainda, a realização de estudos fitoquímicos e farmacológicos, objetivando a descoberta de moléculas de valor medicinal para o desenvolvimento de medicamentos (VANISREE et al., 2004).

A produção de metabólitos farmacologicamente ativos e/ou sua otimização pode ser alcançada com diferentes técnicas de cultura de tecidos vegetais, utilizando-se tanto culturas organizadas, por exemplo, brotos e raízes, quanto não organizadas, como calos e células em suspensão (FRANÇA, 2004; GEORGE et al., 2008; KARUPPUSAMY, 2009).

Dentre as culturas não organizadas, a cultura de calos consiste na indução e proliferação de massas celulares desorganizadas a partir de diferentes tipos de explantes cultivados em condições nutricionais, hormonais e ambientais adequadas (TORRES et al., 1998). Embora, os calos sejam considerados tecidos não organizados por muitos autores, George e colaboradores (2008) afirma que a massa calogênica não é indiferenciada, apresentando certo grau de diferenciação celular. Segundo Termignoni (2005), este sistema obtido *in vitro* possui um arranjo específico de células, e gradientes nutricionais e fito-hormonais orientados acropetamente, partindo da base, em direção à superfície. Alguns tipos de células especializadas podem ser formadas ao acaso nos centros de morfogênese. A partir destas células especializadas surgem traqueídeos, células parenquimáticas, tecido cambial e periderme, sendo possível iniciar a formação de órgãos como raízes,

brotos e embriões somáticos (GEORGE et al. 2008; NARAYANASWAMY, 1977; TERMIGNONI, 2005).

Para ocorrer a indução de calos, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência, ou seja, explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O processo de calogênese pode resultar na formação de calos com diferentes consistências, sendo a consistência influenciada pelo tipo e concentração de auxina, pela concentração de citocinina, pelo tipo de explante e pelo genótipo (REMOTTI; LÖFFLER, 1995). Calos com diferentes características, geralmente, apresentam respostas morfogênicas diversas.

Os calos compactos apresentam alta coesão celular, e geralmente, são calos de coloração verde; possuem regiões com atividade citocinínica, sendo caracterizados como calos organogênicos, ou seja, mais propícios à regeneração. Os calos friáveis apresentam baixa coesão celular, tendo a característica de se desintegrarem facilmente quando manipulados. Estes geralmente têm coloração branca e possuem regiões com alta atividade auxínica (TERMIGNONI, 2005). Os calos friáveis são mais indicados para a produção de substâncias bioativas, podendo representar um sistema de produção contínua dessas substâncias *in vitro* (SIMÕES et al., 2009b). A aparência dos calos também pode ser considerada um fator importante para o sucesso da indução de embriogênese somática (SADO, 2009).

A friabilidade dos calos é importante para o cultivo de células em suspensão. O cultivo de linhagens celulares de calos friáveis em meio líquido, sob agitação contínua, permite a formação de um sistema homogêneo, onde as células se dividem rapidamente e se dispersam facilmente no meio de cultura, de forma livre ou formando agregados.

A cultura de células em suspensão é a técnica mais indicada para a produção de metabólitos especiais *in vitro* (GEORGE et al., 2008). Este tipo de cultura pode acumular substâncias bioativas em níveis mais elevados do que a planta da qual ela se originou (REBOUÇAS; ALMEIDA, 2009). E ainda, há relatos de culturas de células em suspensão com maior produção de biomassa e substâncias de interesse do que culturas de calos (BOONSNONGCHEEP et al., 2010; FEDERICI et al., 2003; SIMÕES-GURGEL et al., 2011).

O cultivo de células permite estudar a biossíntese dessas substâncias de interesse do metabolismo secundário e identificar seus eventos modulatórios. E permite, ainda, promover o aumento da produção dessas substâncias com o uso de precursores dessas vias biossintéticas e elicitores (KARUPPUSAMY, 2009; KRAEMER et al., 2002).

Na técnica de cultivo de células em suspensão, muitas vezes o metabólito de interesse é liberado para o meio de cultura (GEORGE et al., 2008), o que facilita a sua extração e a manutenção da cultura. Inclusive, a liberação dos metabólitos para o meio é uma das estratégias fundamentais para viabilizar economicamente a produção em larga escala destes metabólitos (AMARAL; SILVA, 2003).

A produção de metabólitos pela cultura de células em suspensão em pequena escala pode ser realizada em um sistema fechado, como por exemplo, em um erlenmeyer. Este sistema é denominado "batch cultures", onde as células são inoculadas em um volume fixo de meio de cultura. Neste sistema, o crescimento da cultura ocorre até a fase estacionária, quando atinge seu limite máximo, devido ao esgotamento dos nutrientes do meio e ao acúmulo de metabólitos. Em outro tipo de cultura, denominada contínua, ocorre a reposição constante do meio de cultura, com retirada do meio rico em metabólitos secundários, mantendo-se a cultura (CHATTOPADHYAY et al., 2002).

Poucos trabalhos sobre cultura de calos e cultura de células em suspensão de espécies de *Cleome* existem na literatura (ALBARELLO et al., 2007; ROCHA et al., 2013; SIMÕES et al., 2009b; SONGSAK; LOCKWOOD, 2004), inclusive com produção de metabólitos de interesse. Porém sobre a espécie em estudo não há trabalhos biotecnológicos ou fitoquímicos.

Diante do potencial da espécie e da ausência de trabalhos na área de cultura de tecidos vegetais, torna-se relevante a definição do primeiro protocolo de cultura de calos e de cultura de células em suspensão visando à produção de metabólitos de interesse.

6.2 Objetivos

Geral

Definir um protocolo eficiente para o estabelecimento de cultura de calos e cultura de células em suspensão visando à produção de metabólitos *in vitro* da espécie *Cleome dendroides* Schult. & Schult. f. (Cleomaceae).

Específicos

- ❖ Avaliar o efeito da origem e tipo do explante, dos tipos e das concentrações de reguladores de crescimento sobre a produção de calos;
- ❖ Estabelecer um protocolo de manutenção da cultura de calos;
- ❖ Avaliar o efeito da origem do explante e do tamanho do inóculo sobre o estabelecimento da cultura de células em suspensão;
- ❖ Estabelecer um protocolo de manutenção da cultura de células em suspensão;
- ❖ Avaliar a presença de substâncias químicas nas culturas de calos e de células em suspensão utilizando análises histoquímica e fitoquímica.

6.3 Material e Métodos

Os experimentos biotecnológicos e histoquímicos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os experimentos fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal/IBRAG e no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), do Departamento de Bioquímica (DBq/IBRAG).

6.3.1 Material vegetal

Como fonte de explantes, foram utilizadas plantas de duas origens: desenvolvidas de sementes germinadas sob condições *in vitro* e mantidas em estoque *in vitro*.

Plântulas oriundas de germinação *in vitro* (Item 3) foram obtidas de sementes maduras retiradas de frutos desenvolvidos em espécimes de *Cleome dendroides* localizados no Morro Alto Mourão (22° 58' 04" S e 43° 01' 17" W), no Parque Estadual da Serra da Tiririca, no município de Niterói, RJ. Foram utilizadas plântulas com 45 dias de idade.

Outra fonte foram plantas provenientes de manutenção de estoque *in vitro* (Item 4), em meio MS0, após 30 dias de subcultivo.

6.3.2 Estabelecimento da cultura de calos

Foram testados explantes correspondentes à região do hipocótilo (1 cm), de lâmina foliar (1 cm²) e de raiz proximal (1 cm) de plântulas oriundas de germinação *in vitro*. E foram testados explantes correspondentes à região do caule contendo um nó (1 cm), de lâmina foliar (1 cm²) e de raiz proximal (1 cm), de plantas provenientes de manutenção de estoque *in vitro*.

Os explantes foram excisados e inoculados em meio de cultura básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ das auxinas: ácido 1-naftalenoacético (ANA), ácido 3-indolacético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e picloram (PIC), isoladas ou em combinação com 0,1 mg.L⁻¹ cinetina (KIN).

O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da solidificação com 0,8% de ágar (Merck) e esterilização em autoclave a 121°C (1 atm), por 15 min. Em cada frasco de vidro (80 x 60 mm) contendo 30 mL de meio, foram inoculados quatro explantes, obedecendo à polaridade do órgão, no caso dos segmentos hipocotiledonares ou caulinares. Para os explantes foliares, a face adaxial permaneceu em contato com o meio. E os explantes radiculares foram dispostos horizontalmente ao meio. Em cada tratamento foram realizadas cinco repetições de quatro explantes. Cada experimento foi repetido duas vezes.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob intensidade luminosa de $45\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

Após 45 dias em cultura, foram avaliadas as respostas morfogênicas e os pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS) dos calos. Para a determinação de PF e PS utilizou-se balança de precisão (AND mod. HR-200) (0,1 mg), sendo que para PS, os calos foram mantidos em estufa a 45°C , até peso constante.

6.3.3 Manutenção da cultura de calos

Calos desenvolvidos na melhor condição de cultivo foram subcultivados mensalmente para meio fresco de igual composição (1 calo/frasco). As culturas permaneceram nas condições ambientais descritas acima.

Foi realizada a manutenção da cultura de calos, por sucessivas subculturas, com o objetivo de constituir um estoque de material biotecnológico para posteriores análises fitoquímicas.

6.3.4 Estabelecimento da cultura de células em suspensão (CCS)

Calos friáveis, com 90 dias de cultivo, desenvolvidos no meio de cultura que propiciou a maior produção de biomassa, foram selecionados para iniciar a cultura de células em suspensão (CCS). Com o objetivo de estabelecer a quantidade de massa calogênica mais adequada para o início da CCS, foram avaliados inóculos de 2, 3 e 4 g.

Em câmara de fluxo laminar, os calos foram macerados em placas de Petri com o auxílio de uma espátula. Pequenas porções de massa calogênica foram acondicionadas em frascos de vidro estéreis, os quais foram pesados em balança de precisão até se obter o inóculo desejado. Em seguida, os inóculos foram colocados

em erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura líquido MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a mesma suplementação hormonal do meio de calogênese. Os frascos erlenmeyer foram vedados com tampas duplas de papel alumínio.

O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121°C (1 atm), por 15 min. Em cada tratamento foram realizadas dez repetições, sendo cada erlenmeyer uma repetição. Cada experimento foi repetido duas vezes.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sob intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h, sob agitação em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), com velocidade constante de 110 rpm.

Após duas semanas, o crescimento da cultura foi avaliado pela aferição do PF e do PS. Para determinação do PF, em câmara de fluxo laminar, as CCS foram filtradas a vácuo, em filtrador Nalgene®, com filtro de nylon ($45 \mu\text{m}$). As células foram colocadas em frascos de vidro e pesadas em balança de precisão (AND mod. HR-200) (0,1 mg). Para a determinação do PS, as células foram colocadas em placas de Petri e secas em estufa a 45°C , até peso constante. Os resultados foram expressos como aumento do peso de matéria fresca e de matéria seca.

O aumento do peso de matéria fresca (%) foi calculado segundo a fórmula:

$$\frac{\text{PF}_f - \text{PF}_i}{\text{PF}_i} \times 100,$$

onde PF_i = peso de matéria fresca inicial; PF_f = peso de matéria fresca final.

O aumento do peso de matéria seca (%) foi calculado segundo a fórmula:

$$\frac{\text{PS}_f - \text{PS}_i}{\text{PS}_i} \times 100,$$

onde PS_i = peso de matéria seca inicial; PS_f = peso de matéria seca final.

Avaliou-se, ainda, a viabilidade celular, a qual foi determinada utilizando-se o teste topográfico de tetrazólio. Após filtração, cerca de 0,5 g de célula de cada cultura foi colocado em eppendorf de 2 mL e foi adicionado 1 mL de solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) 1% (p/v). Após 5 h, a 30°C , sob ausência de luz, avaliou-se a coloração das células, a fim de distinguirem-se as culturas viáveis das não viáveis (LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA 2006).

6.3.5 Curva de crescimento

Após a definição dos melhores parâmetros para o estabelecimento da CCS, foi realizado um experimento para se definir a curva de crescimento da CCS, visando estabelecer o período adequado para o subcultivo das culturas.

O crescimento da CCS foi acompanhado durante 28 dias, sendo que a cada dois ou três dias, três erlenmeyers de cultura foram retirados aleatoriamente para avaliação do aumento do PF e do PS, após filtração a vácuo, em filtrador Nalgene®, com filtro de nylon (45 µm). Avaliou-se, ainda, o pH do filtrado e a viabilidade celular, conforme descrito anteriormente.

As culturas permaneceram nas condições ambientais indicadas acima.

6.3.6 Manutenção da cultura de células em suspensão

Com o objetivo de avaliar a capacidade de manutenção das CCS por sucessivas subculturas, acompanhou-se o acúmulo de biomassa por três subculturas. Realizou-se o subcultivo das CCS conforme definido pela curva de crescimento.

As culturas foram mantidas nas melhores condições de cultivo. A cada subcultura, as CCS foram filtradas a vácuo, sendo que a mesma quantidade de inóculo inicial foi transferida para meio fresco de igual composição. Ao final de cada subcultura, avaliou-se o aumento do PF das CCS. Foram realizadas 10 repetições por subcultura.

As culturas permaneceram nas condições ambientais descritas anteriormente.

6.3.7 Análise estatística

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com dez repetições, sendo cada bloco representado por uma repetição. Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.00.

6.3.8 Análise histoquímica

Com o objetivo de avaliar a presença de algumas classes de substâncias químicas nas culturas de calos e de células em suspensão, foram realizados testes

histoquímicos em material a fresco. Para isto foram empregados os seguintes reagentes: Lugol para registrar a presença de amido (JOHANSEN, 1940); Dragendorff (SVENDSEN; VERPOORTE, 1983) e Dittmar (FURR; MAHLBERG, 1981) para alcaloides; cloreto férrico (KRAUS; ARDUIN, 1997) e vanilina clorídrica para tanino; dicromato de potássio para fenois (GABE, 1968); Sudan III para substâncias de natureza lipídica (SASS, 1951).

As fotomicrografias foram obtidas com microscópio Nikon Eclipse TS100 provido de equipamento fotográfico Moticam 5.0.

6.3.9 Análise fitoquímica

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal/IBRAG.

6.3.9.1 Extração

Amostras foram extraídas seguindo a metodologia proposta por Costa (2000). Calos cultivados em meio MS + 1,0 mg.L⁻¹ PIC + 0,1 mg.L⁻¹ KIN, com 30 dias em cultura, foram secos em estufa a 45°C por cerca de 24 h, até peso constante. O material seco foi extraído com HCl 1N, sob refluxo, por 10 min. Após resfriamento e filtração em papel de filtro Whatman N°1, alcalinizou-se a solução com NH₄OH 1 N. A solução foi, então, particionada com éter etílico P.A. (Vetec). A fase etérea obtida foi evaporada sob vácuo (evaporador rotativo Marconi®) e, em seguida, foi calculado o rendimento da extração.

6.3.9.2 Análise por espectrofotometria de UV

O resíduo da extração foi ressolubilizado em éter etílico P.A. (Vetec) e analisado em espectrofotômetro Thermo Scientific™ (Biomate 3S UV-Visível) na região do UV (200 a 800 nm).

6.3.9.3 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Para análise por cromatografia em camada delgada (CCD), o extrato foi aplicado em placa para CCD ALUGRAM® Xtra SIL G/ UV 254 nm 10 x 10 cm, espessura de 0,20 mm (MachareyNagel®). A aplicação foi realizada em forma de

banda com o auxílio de um tubo capilar. Utilizou-se como fase móvel acetato de etila/metanol (50:50 v/v), que foi preparada no momento da análise.

Para o desenvolvimento dos cromatogramas por CCD, as placas foram eluídas em cuba cromatográfica de vidro com um volume total de eluente que não alcançava a altura da amostra aplicada na placa de CCD. Após a eluição, quando a frente do solvente atingiu a distância de 1 cm da extremidade superior, a placa foi retirada da cuba com auxílio de pinça e transferida para capela de exaustão a fim de evaporar o solvente residual. O revelador utilizado foi o reagente de Dragendorff, aplicado utilizando-se um borrifador, até o surgimento de bandas coloridas.

6.3.9.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O resíduo da extração foi ressolubilizado em acetonitrila e submetido à análise prévia em CLAE com detector photodiode array (Ultimate 3000 Dionex). Como fase estacionária foi utilizada a coluna thermo-scientific RP18 (250 mm x 4,6 mm, com partícula de 5 Å), a fim de se estabelecer uma condição de resolução cromatográfica. A eluição foi feita com fluxo de 1 mL/min por 45 min. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (MilliQ®) acidificada com ácido acético glacial pH 3,0 (Sigma-Aldrich) (A) e acetonitrila (Tedia®) (B), utilizando a seguinte eluição: 0% de B isocrático em 5 min; gradiente linear de 0% a 2% de B em 5 min; 2% de B isocrático em 5 min; gradiente linear de 2% a 3% de B em 5 min; 3% de B isocrático em 5 min; gradiente linear de 3% a 4% de B em 5 min; 4% de B isocrático em 5 min; gradiente linear de 4% a 5% em 5 min; e por fim 5% de B isocrático até 45 min. Foram injetados 20 µL de amostra.

6.3.10 Análise de glicosinolatos

6.3.10.1 Extração

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal/IBRAG.

As células foram trituradas com água destilada (5 mL/g) e mantidas por 17-20 h sob agitação, em mesa agitadora orbital (New Brunswick Scientific), com velocidade constante de 110 rpm, a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, em ausência de luz, para hidrólise. Após este tempo, realizou-se a filtração em papel de filtro Whatman N°1, e em

seguida, a partição com diclorometano P.A. numa relação de volume 1:1. A partição foi repetida por três vezes, sendo a fase aquosa descartada. A fase de diclorometano foi concentrada sob vácuo (evaporador rotativo Marconi®), a 25°C, e ressolubilizada em diclorometano grau HPLC (Vetec) a 2 mg.mL⁻¹.

6.3.10.2 Análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIA-BPPN), do Departamento de Bioquímica (DBq/IBRAG).

Todos os extratos foram analisados por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu GCMS-QP2010 Plus com coluna Rtx[®] 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm RESTEK USA), com fluxo de 1,58 mL/min, divisão de fluxo de 10:0, e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 260°C, do detector de 290°C e da interface de 200°C.

A programação da temperatura empregada foi: temperatura inicial de 50°C por 3 min, com aumento até 290°C numa razão de 3°C/min; permaneceu a 290°C por 1 min, totalizando 84 min. Foram injetados 1 µL de cada amostra.

A faixa de varredura das razões massa/carga (m/z) foi de 40 a 500. A energia de ionização foi de 10 eV. A identificação das substâncias foi realizada por comparação do perfil de fragmentação dos espectros de massas obtidos com aqueles da biblioteca eletrônica do equipamento (NIST05.LIB) e do porcentual de similaridade.

6.4 Resultados

6.4.1 Estabelecimento da cultura de calos a partir de plântulas oriundas de germinação *in vitro*

Neste experimento, avaliou-se o efeito de diferentes auxinas sobre a calogênese a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*.

Os três tipos de explantes, na maioria dos meios testados, apresentaram início de resposta morfogênica na primeira semana de cultivo. Após 15 dias, calogênese foi observada em meios suplementados com ANA ou 2,4-D ou PIC isolados ou em combinação com KIN (Figura 34). Em explantes foliares, o início da calogênese ocorreu nos bordos do explante, principalmente na região de corte, e na nervura principal, permanecendo o restante do explante com coloração verde, na maioria dos meios testados. Nos explantes hipocotiledonares, a formação de calos iniciou-se na base, região em contato com o meio, mantendo o ápice com coloração verde, na maioria dos meios, enquanto nos explantes radiculares, a calogênese foi observada por todo explante. Os calos possuíam coloração branca a bege clara e aspecto friável.

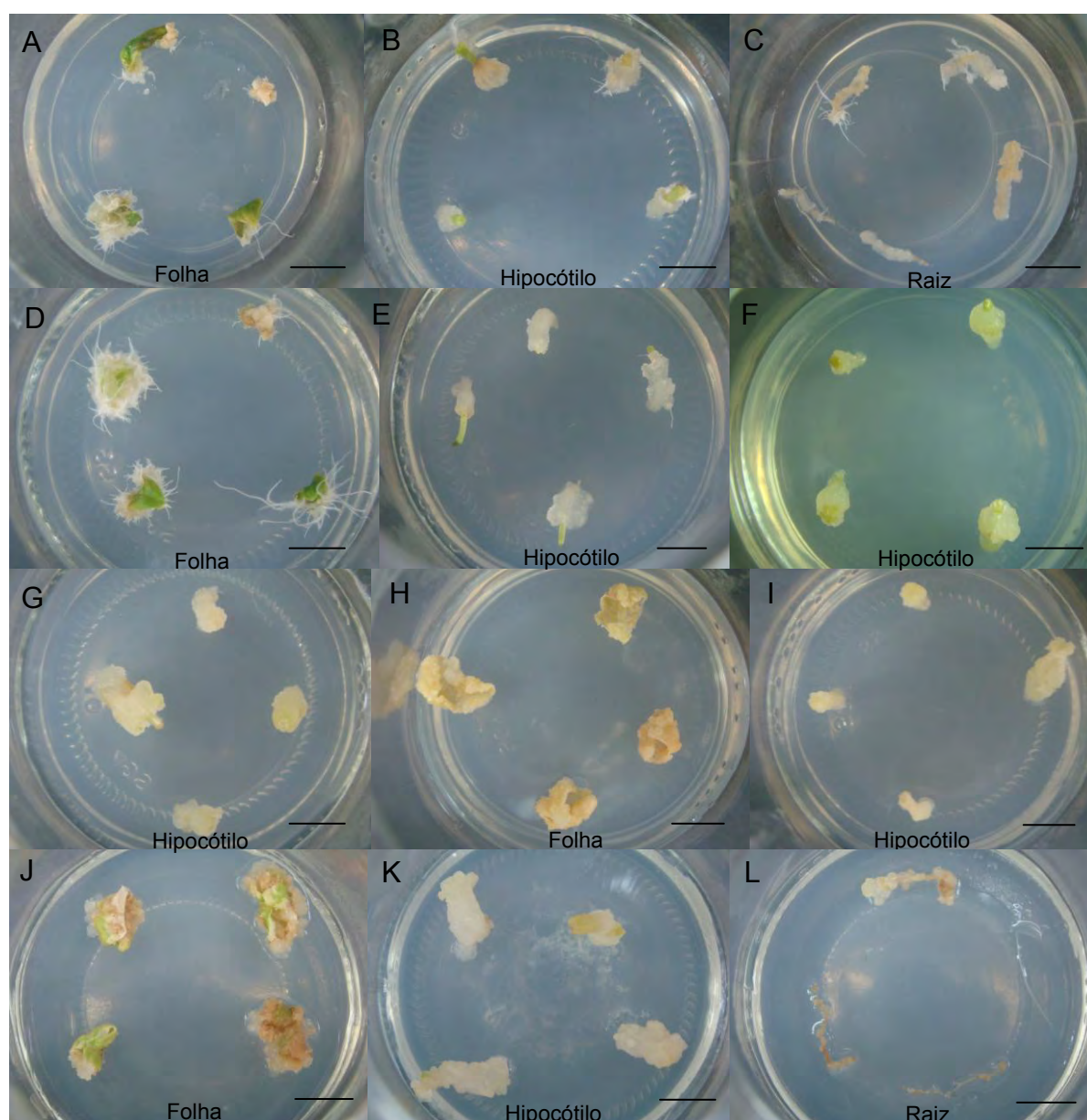
Outras respostas morfogênicas foram induzidas no início da cultura, como cauligênese e rizogênese. Estas respostas variaram conforme o tipo de explante e a suplementação do meio de cultura. Em meios com ANA isolado, por exemplo, além da calogênese, ocorreu rizogênese nos três tipos de explantes (Figuras 34A, 34B, 34C), enquanto em meios com ANA adicionado de KIN, houve indução de rizogênese em explantes foliares, e, de calogênese em explantes hipocotiledonares (Figuras 34D, 34E). 2,4-D e PIC, após 15 dias do início da cultura, promoveram apenas calogênese nos três tipos de explantes (Figuras 34F - 34L). Em meios com AIA ou AIA + KIN ocorreu indução de rizogênese em explantes de folha, e, de cauligênese em hipocótilo.

Após 45 dias, em meios suplementados com PIC ou PIC + KIN observou-se apenas calogênese, nos três tipos de explantes (Tabela 25). Os explantes de folha e de raiz apresentavam calogênese por todo explante. Os explantes de hipocótilo, a partir da base, mas também por todo explante (Figuras 35A - 35F).

Em meios com 2,4-D ou 2,4-D + KIN, calogênese foi a resposta preponderante (Figuras 36A - 36F), ocorrendo uma pequena porcentagem de

rizogênese (5-10%), principalmente em explantes de hipocótilo. As raízes formadas eram brancas, finas e bem pilosas, originando-se dos calos (Figura 36B) (Tabela 25).

Figura 34 - Diferentes respostas morfogênicas em explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares de *Cleome dendroides* provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 15 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes auxinas isoladas (ANA, 2,4-D, PIC) ou em combinação com KIN.



Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA; D, E: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA + 0,1 mg.L⁻¹ KIN; F: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D; G: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ KIN; H; I: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ PIC; J; K; L: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ PIC + 0,1 mg.L⁻¹ KIN. Barras: 1 cm.

Quando se utilizou AIA isolado, explantes foliares e radiculares apresentaram apenas rizogênese (Figura 37A, 37C). AIA em combinação com KIN, induziu, além da rizogênese, calogênese em 95% dos explantes de raiz (Figura 37F) (Tabela 25). Em explantes hipocotiledonares, nos meios com AIA isolado ou em combinação com KIN, foi observada indução de gemas adventícias no ápice e regeneração de brotos (Figura 37B, 37E). Apesar da alta porcentagem de calogênese (100%) neste tipo de explante (Tabela 25), calos ocorreram apenas na base.

Em meios com ANA isolado ou em combinação com KIN, rizogênese foi a principal resposta morfogênica em explantes foliares, ocorrendo também nos demais tipos de explantes (Figuras 38A - 38F). O peso de matéria fresca final dos explantes foliares com raízes adventícias variou de 100 a 400 mg, enquanto o peso de matéria seca, de 10 a 30 mg. Estas raízes adventícias foram induzidas a partir das nervuras foliares.

Ainda em meios com ANA, indução de gemas adventícias no ápice também foi visualizada em explantes hipocotiledonares, como em meios com AIA, além de rizogênese e calogênese na base (Figuras 38B, 38E).

Os calos induzidos nos diferentes meios mantiveram a coloração branca a bege clara inicial e possuíam consistência friável.

Uma vez que meios suplementados com PIC ou 2,4-D isolados ou em combinação com KIN promoveram as maiores porcentagens de calogênese, independente do tipo de explante (Tabela 25), além do fato desta ser a resposta morfogênica preponderante, optou-se por avaliar o peso de matéria fresca (PF) e o peso de matéria seca (PS), após 45 de cultivo, apenas nestes meios (Tabela 26).

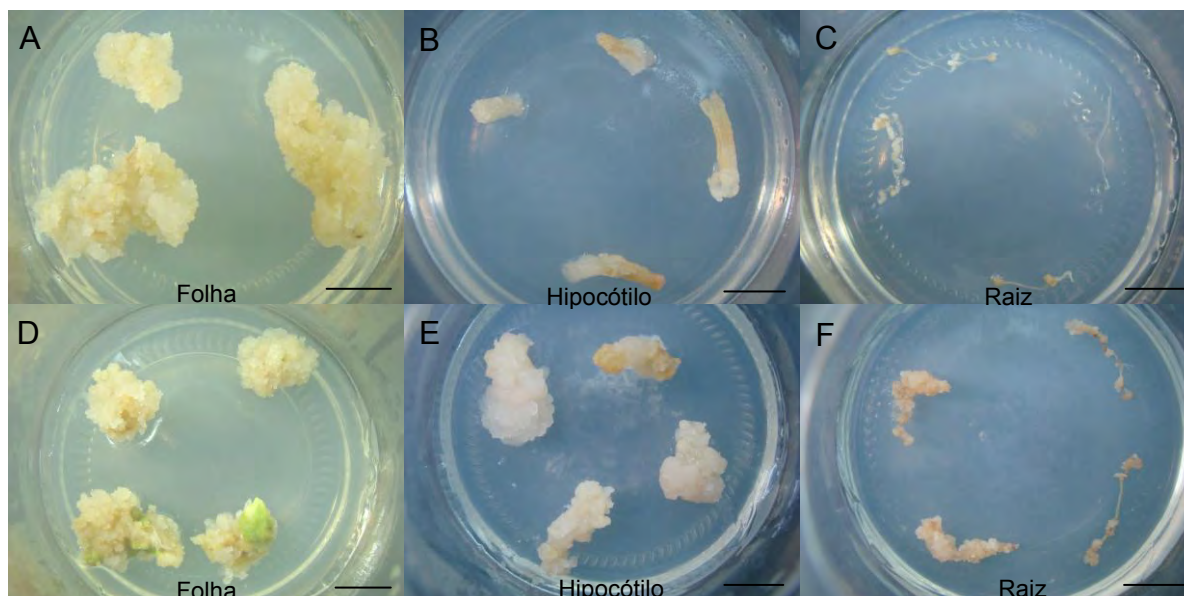
A produção de massas calogênica foi superior em explante foliar, em todos os meios testados, tanto em relação ao PF, quanto ao PS, sem diferença significativa, exceto, no caso de explante hipocotiledonar, em meio com PIC + KIN, o qual não apresentou diferença significativa no PF em relação ao explante foliar. Destaque ao explante foliar, em meio com PIC + KIN, que alcançou os maiores valores de PF e PS (PF = $482,8 \pm 64,3$ mg e PS = $40,9 \pm 3,6$ mg) (Tabela 26).

Tabela 25 - Diferentes respostas morfogênicas em explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares de plântulas de *Cleome dendroides* oriundas de germinação *in vitro*, em meio MS suplementado com as auxinas PIC, 2,4-D, AIA, ANA, isoladas ou em combinação com KIN, após 45 dias em cultura.

Regulador de crescimento (mg.mL ⁻¹)	Tipo de explante	Calogênese (%)	Cauligênese (%)	Rizogênese (%)
PIC (1)	Folha	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^c
	Hipocótilo	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^c
	Raiz	80,0±9,3 ^a	0 ^c	0 ^c
PIC (1) + KIN (0,1)	Folha	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^c
	Hipocótilo	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^c
	Raiz	95,0±5,0 ^a	0 ^b	0 ^c
2,4-D (1)	Folha	100,0±0,0 ^a	0 ^c	5,0±5,0 ^c
	Hipocótilo	100,0±0,0 ^a	0 ^c	10,0±10,0 ^c
	Raiz	40,0±10,0 ^b	0 ^c	0 ^c
2,4-D (1) + KIN (0,1)	Folha	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^c
	Hipocótilo	100,0±0,0 ^a	0 ^c	5,0±5,0 ^c
	Raiz	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^c
AIA (1)	Folha	0 ^c	0 ^c	50,0±17,7 ^b
	Hipocótilo	100,0±0,0 ^a	75,0±5,0 ^a	60,0±10,0 ^b
	Raiz	0 ^c	0 ^c	75,0±11,2 ^{ab}
AIA (1) + KIN (0,1)	Folha	0 ^c	0 ^c	5,0±5,0 ^c
	Hipocótilo	100,0±0,0 ^a	30,0±14,6 ^b	25,0±11,2 ^{bc}
	Raiz	95,0±5,0 ^a	0 ^c	95,0±5,0 ^a
ANA (1)	Folha	35,0±17,0 ^b	0 ^c	95,0±5,0 ^a
	Hipocótilo	80,0±20,0 ^a	10,0±6,1 ^c	75,0±11,2 ^{ab}
	Raiz	100,0±0,0 ^a	0 ^c	80,0±20,0 ^{ab}
ANA (1) + KIN (0,1)	Folha	20,0±14,6 ^b	5,0±5,0 ^c	100,0±0,0 ^a
	Hipocótilo	85,0±15,0 ^a	25,0±15,8 ^b	80,0±9,3 ^{ab}
	Raiz	95,0±5,0 ^a	0 ^c	70,0±20,0 ^{ab}

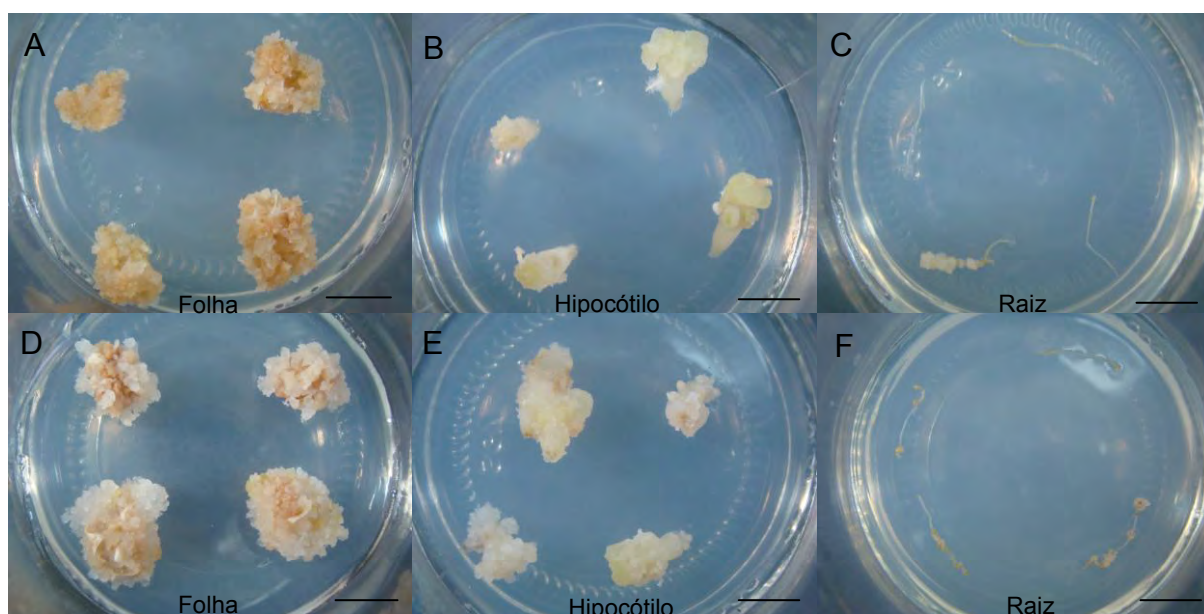
Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 35 - Cultura de calos de *Cleome dendroides* a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com PIC isolado ou em combinação com KIN.



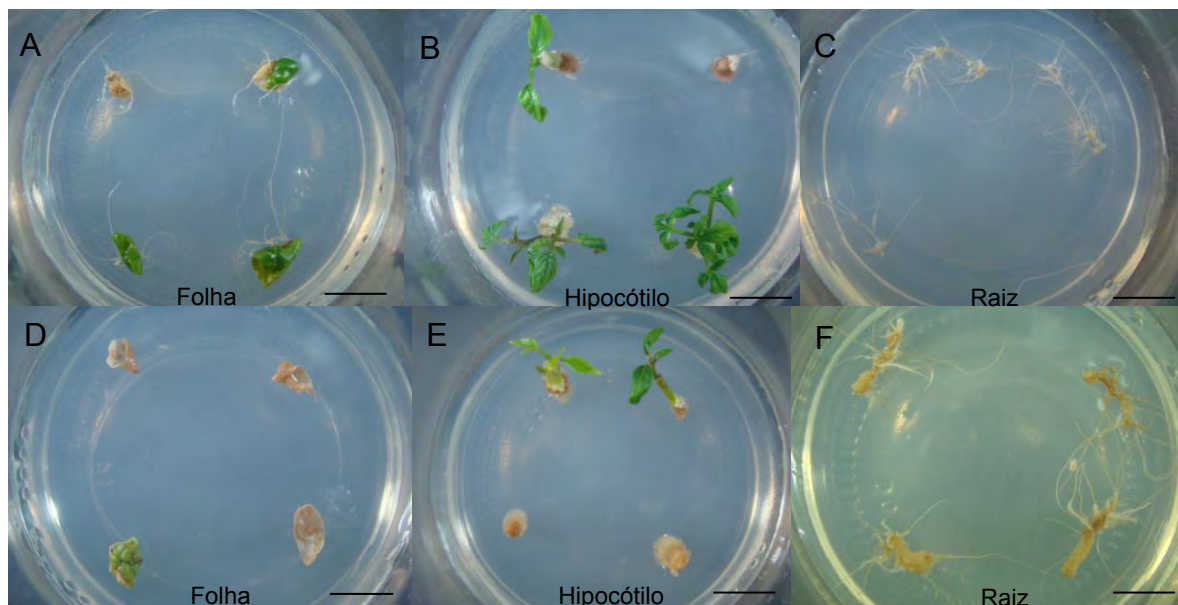
Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ PIC; D; E; F: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ PIC + 0,1 mg.L⁻¹ KIN. Barras: 1 cm.

Figura 36 - Cultura de calos de *Cleome dendroides* a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D isolado ou em combinação com KIN.



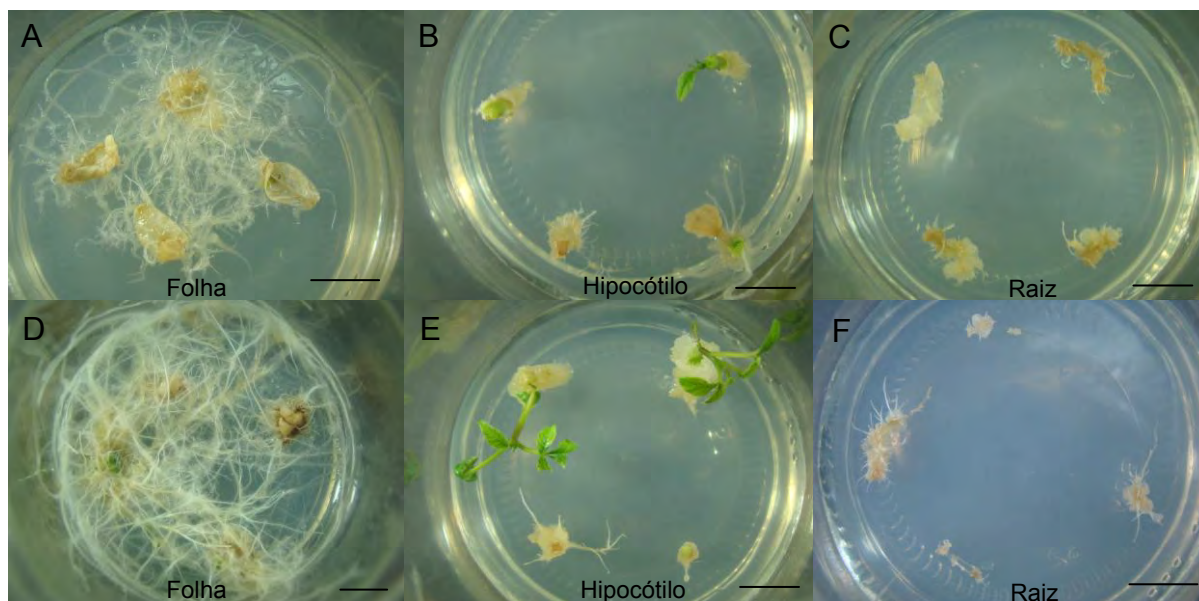
Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D; D; E; F: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ KIN. Barras: 1 cm.

Figura 37 - Cultura de calos de *Cleome dendroides* a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com AIA isolado ou em combinação com KIN.



Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ AIA; D; E; F: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ AIA + 0,1 mg.L⁻¹ KIN. Barras: 1 cm.

Figura 38 - Cultura de calos de *Cleome dendroides* a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com ANA isolado ou em combinação com KIN.



Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA; D; E; F: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA + 0,1 mg.L⁻¹ KIN. Barras: 1 cm.

Tabela 26 - Influência das auxinas PIC e 2,4-D, isoladas ou em combinação com KIN, sobre a produção de massa calogênica a partir de explantes foliares, hipocotiledonares e radiculares de plântulas de *Cleome dendroides* oriundas de germinação *in vitro*, após 45 dias em cultura.

Regulador de crescimento (mg.mL ⁻¹)	Tipo de explante	Peso de matéria fresca (mg)	Peso de matéria seca (mg)
PIC (1)	Folha	467,0±71,4 ^a	36,3±4,3 ^{ab}
	Hipocótilo	129,8±13,6 ^b	9,7±0,6 ^{bc}
	Raiz	17,3±7,6 ^c	2,0±0,6 ^c
PIC (1) + KIN (0,1)	Folha	482,8±64,3 ^a	40,9±3,6 ^a
	Hipocótilo	318,6±47,7 ^{ab}	22,8±2,6 ^b
	Raiz	81,31±23,3 ^b	7,5±2,0 ^{bc}
2,4-D (1)	Folha	292,6±36,0 ^{ab}	27,7±2,7 ^{ab}
	Hipocótilo	147,6±19,1 ^b	12,6±1,2 ^b
	Raiz	11,0±4,7 ^c	1,3±0,3 ^c
2,4-D (1) + KIN (0,1)	Folha	326,2±54,4 ^{ab}	30,3±3,9 ^{ab}
	Hipocótilo	180,2±22,9 ^b	14,0±1,6 ^b
	Raiz	11,1±5,2 ^c	1,6±0,5 ^c

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.4.2 Estabelecimento da cultura de calos a partir de plantas mantidas em estoque *in vitro*

Neste experimento, avaliou-se o efeito de diferentes auxinas sobre a calogênese a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares provenientes de plantas mantidas em estoque *in vitro* (MS0).

Os três tipos de explantes, na maioria dos meios testados, apresentaram início de resposta morfogênica na segunda semana de cultivo. O início da calogênese ocorreu da mesma forma que em explantes provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*. Na maioria dos meios que promoveu calogênese, os calos possuíam coloração branca a bege escura e aspecto friável.

Outras respostas morfogênicas, como cauligênese e rizogênese, foram induzidas nos explantes. Estas respostas, assim como ocorreu com explantes

provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, variaram conforme o tipo de explante e a suplementação hormonal.

Após 45 dias, em meios suplementados com PIC, observou-se apenas calogênese, nos três tipos de explantes (Figuras 39A, 39B, 39C) (Tabela 27). Os explantes foliares e os caulinares tornaram-se bege claros, com calos por todo explante. Quando houve a combinação de PIC com KIN, ocorreu calogênese apenas em explantes de folha e de caule, que possuíam o mesmo aspecto que em meio com PIC (Figura 39D, 39E). Em explantes de raiz, foi observada apenas rizogênese em 60% dos explantes (Tabela 27) (Figura 39F).

Explantes foliares e caulinares, em meio com 2,4-D isolado ou em combinação com KIN, apresentaram alta porcentagem de calogênese (100%), sendo esta a resposta preponderante (Tabela 27). Os explantes foliares mantiveram-se verdes com calos principalmente nos bordos. Em explantes caulinares, calogênese foi induzida por todo o explante (Figuras 40A, 40B, 40D, 40E). Explantes de raiz mostraram-se pouco responsivos a esta suplementação hormonal (Tabela 27) (Figuras 40C, 40F).

Em meios com AIA isolado ou em combinação com KIN, explantes foliares e radiculares apresentaram apenas rizogênese (Tabela 27). Explantes foliares permaneceram verdes com raízes adventícias formadas a partir da nervura foliar, principalmente na região de excisão (Figuras 41A, 41C, 41D, 41F). Em explantes caulinares, em ambos os meios, verificou-se o desenvolvimento da gema axilar pré-existente e a indução de calogênese na base do explante (Figuras 41B, 41E). Cerca de 20 - 35% destes explantes, em média, apresentaram, ainda, rizogênese (Tabela 27).

Em meios com ANA ou ANA + KIN, a principal resposta morfogênica em explantes de folha e de raiz foi rizogênese (Tabela 27) (Figuras 42 A, 42C, 42D, 49F). A maioria dos explantes foliares tornou-se bege claro com raízes adventícias formadas a partir da nervura foliar. Para explantes hipocotiledonares, cauligênese ocorreu em 95-100% destes, com o desenvolvimento de gema axilar pré-existente, além de formação de calos na base do explante (Tabela 27) (Figuras 42B, 42E).

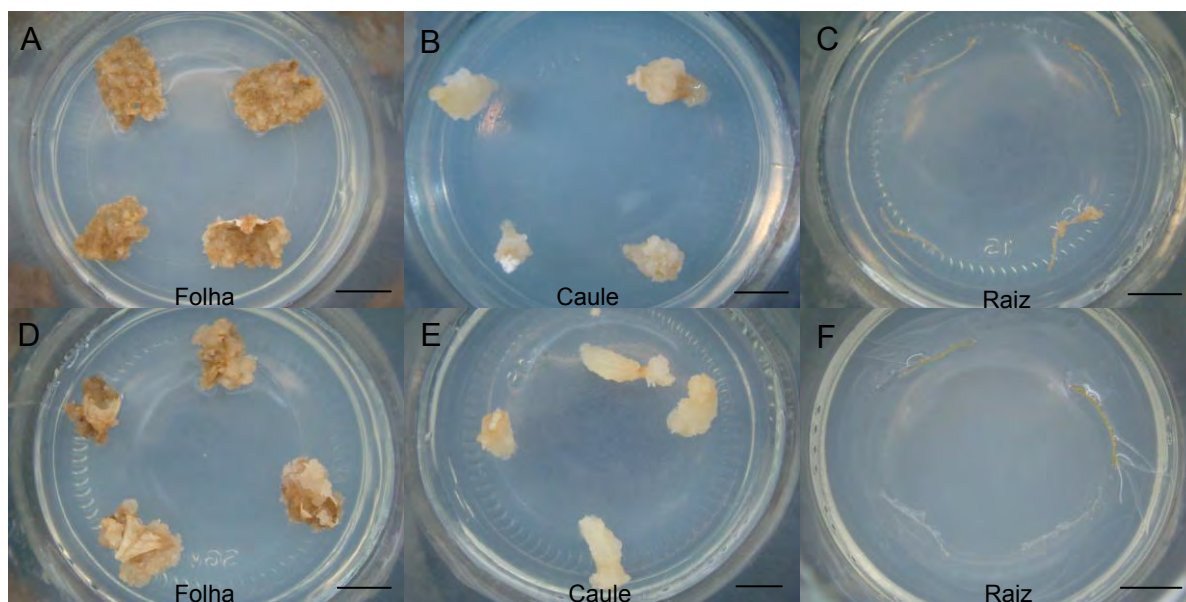
Os calos induzidos nos diferentes meios possuíam coloração branca a bege escura e consistência friável.

Tabela 27 - Diferentes respostas morfogênicas em explantes foliares, caulinares e radiculares de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, em meio MS suplementado com as auxinas PIC, 2,4-D, AIA, ANA, isoladas ou em combinação com KIN, após 45 dias em cultura.

Regulador de crescimento (mg.mL ⁻¹)	Tipo de explante	Calogênese (%)	Cauligênese (%)	Rizogênese (%)
PIC (1)	Folha	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^d
	Caule	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^d
	Raiz	90,0±10,0 ^a	0 ^c	0 ^d
PIC (1) + KIN (0,1)	Folha	40,0±24,5 ^b	0 ^c	0 ^d
	Caule	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^d
	Raiz	0 ^c	0 ^c	60,0±24,5 ^b
2,4-D (1)	Folha	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^d
	Caule	100,0±0,0 ^a	10,0±10,0 ^c	0 ^d
	Raiz	5,0±5,0 ^c	0 ^c	0 ^d
2,4-D (1) + KIN (0,1)	Folha	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^d
	Caule	100,0±0,0 ^a	0 ^c	0 ^d
	Raiz	0 ^c	0 ^c	0 ^d
AIA (1)	Folha	0 ^c	0 ^c	35,0±18,7 ^c
	Caule	100,0±0,0 ^a	95,0±5,0 ^a	35,0±15,0 ^c
	Raiz	0 ^c	0 ^c	70,0±14,6 ^{ab}
AIA (1) + KIN (0,1)	Folha	0 ^c	0 ^c	60,0±18,7 ^b
	Caule	100,0±0,0 ^a	100,0±0,0 ^a	20,0±5,0 ^c
	Raiz	0 ^c	0 ^c	100,0±0,0 ^a
ANA (1)	Folha	5,0±5,0 ^c	0 ^c	90,0±6,1 ^a
	Caule	100,0±0,0 ^a	55,0±14,6 ^b	0 ^d
	Raiz	0 ^c	0 ^c	80,0±14,6 ^a
ANA (1) + KIN (0,1)	Folha	80,0±14,6 ^a	0 ^c	95,0±5,0 ^a
	Caule	95,0±5,0 ^a	75,0±11,2 ^b	5,0±5,0 ^d
	Raiz	15,0±10,0 ^c	0 ^c	70,0±14,6 ^{ab}

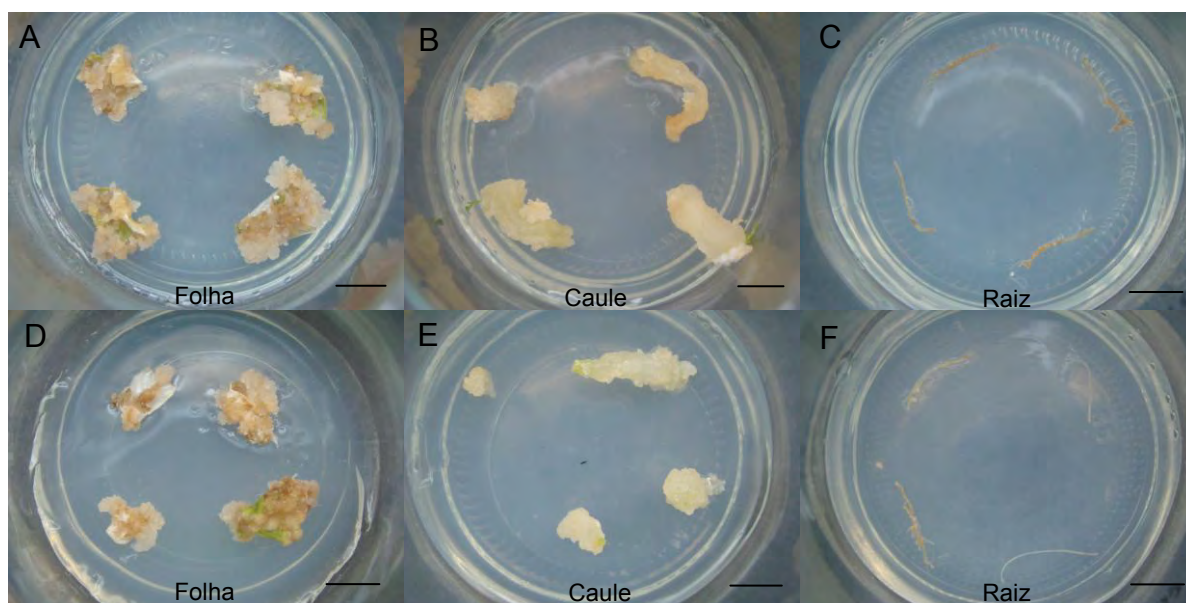
Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 39 - Cultura de calos de *Cleome dendroides* a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares oriundos de plantas mantidas em estoque *in vitro*, após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com PIC isolado ou em combinação com KIN.



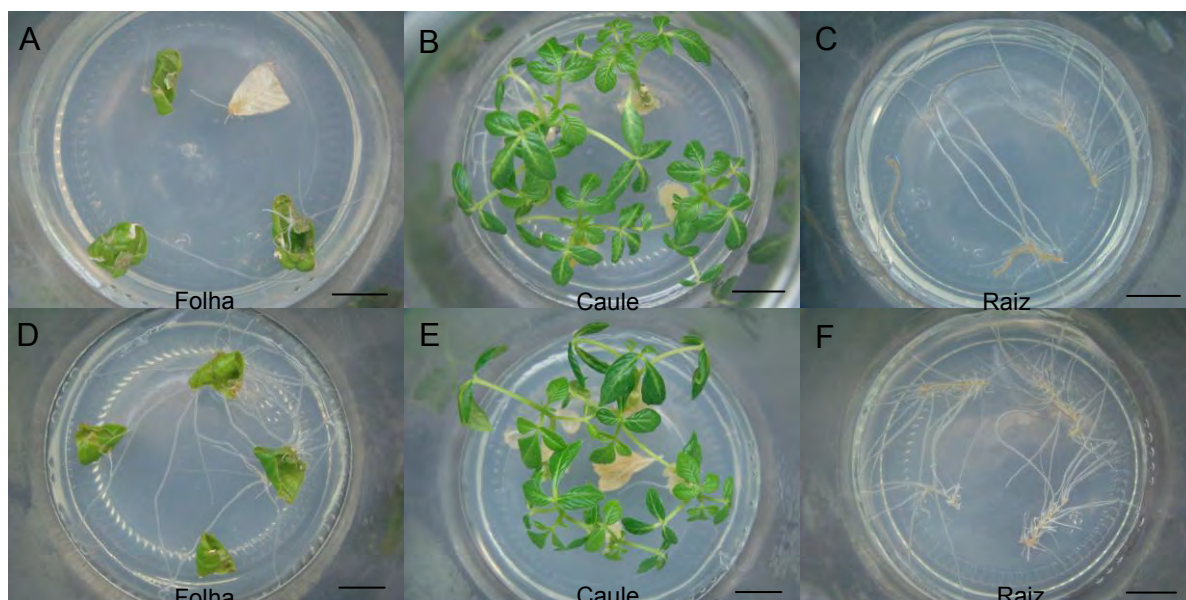
Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L^{-1} PIC; D; E; F: Meio MS + 1 mg.L^{-1} PIC + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN. Barras: 1 cm.

Figura 40 - Cultura de calos de *Cleome dendroides* a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares oriundos de plantas mantidas em estoque *in vitro*, após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D isolado ou em combinação com KIN.



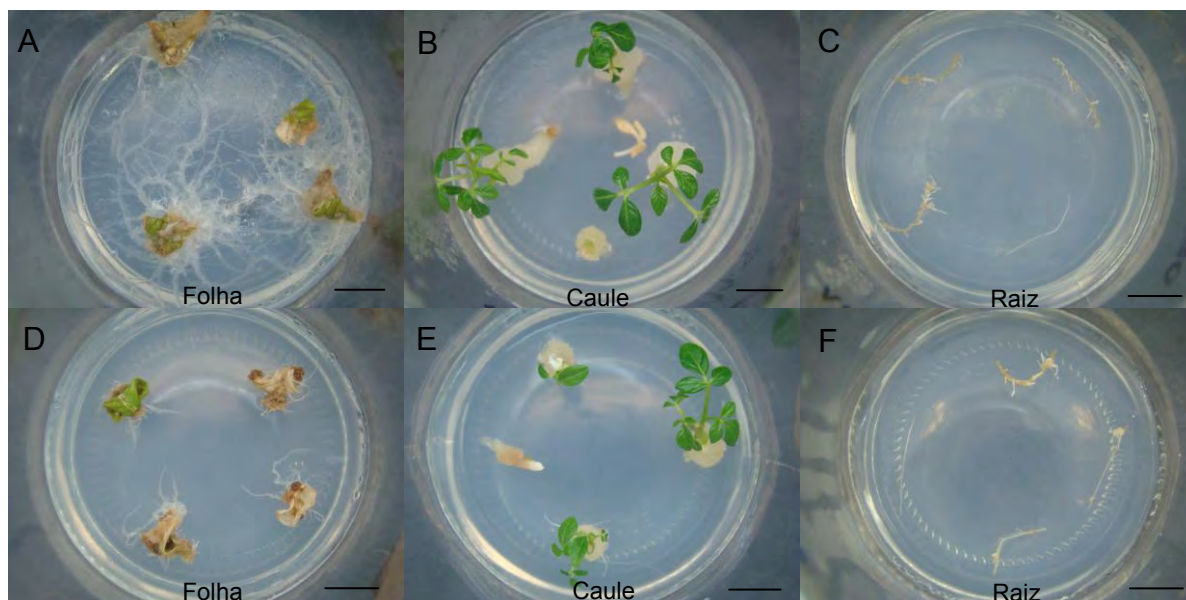
Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L^{-1} 2,4-D; D; E; F: Meio MS + 1 mg.L^{-1} 2,4-D + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN. Barras: 1 cm.

Figura 41 - Cultura de calos de *Cleome dendroides* a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares oriundos de plantas mantidas em estoque *in vitro*, após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com AIA isolado ou em combinação com KIN.



Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ AIA; D; E; F: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ AIA + 0,1 mg.L⁻¹ KIN. Barras: 1 cm.

Figura 42 - Cultura de calos de *Cleome dendroides* a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares oriundos de plantas mantidas em estoque *in vitro*, após 45 dias de cultivo em meio MS suplementado com ANA isolado ou em combinação com KIN.



Legenda: A; B; C: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA; D; E; F: Meio MS + 1 mg.L⁻¹ ANA + 0,1 mg.L⁻¹ KIN. Barras: 1 cm.

Assim como ocorreu no experimento iniciado com explantes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, optou-se por avaliar apenas o PF e o PS, após 45 dias de cultivo, em meios suplementados com PIC ou 2,4-D isolados ou em combinação com KIN (Tabela 28).

Em relação ao PF, a produção de massa calogênica foi superior em explantes foliares e caulinares, sem diferença significativa, exceto para explantes foliares no meio com PIC + KIN. Em relação ao PS, explantes foliares apresentaram maior produção de massa calogênica, exceto em meio com PIC + KIN, onde, ao invés de explantes foliares, os explantes caulinares apresentaram valor superior (Tabela 28)

Tabela 28 - Influência das auxinas PIC e 2,4-D, isoladas ou em combinação com KIN, sobre a produção de massa calogênica a partir de explantes foliares, caulinares e radiculares de plantas de *Cleome dendroides* mantidas *in vitro*, após 45 dias em cultura.

Regulador de crescimento (mg.mL ⁻¹)	Tipo de explante	Peso de matéria fresca (mg)	Peso de matéria seca (mg)
PIC (1)	Folha	324,9±18,3 ^a	32,4±1,4 ^a
	Caule	230,7±31,2 ^a	18,6±2,0 ^b
	Raiz	3,4±0,7 ^c	0,7±0,1 ^c
PIC (1) + KIN (0,1)	Folha	88,3±30,0 ^b	9,1±2,8 ^b
	Caule	268,5±28,1 ^a	23,6±3,2 ^a
	Raiz	7,4±3,0 ^c	5,3±2,6 ^c
2,4-D (1)	Folha	238,8±24,8 ^a	25,1±2,2 ^a
	Caule	264,4±30,4 ^a	19,6±1,8 ^b
	Raiz	8,3±3,5 ^c	0,8±0,2 ^c
2,4-D (1) + KIN (0,1)	Folha	233,1±22,6 ^a	25,4±2,3 ^a
	Caule	224,6±22,5 ^a	17,9±1,5 ^b
	Raiz	6,2±1,5 ^c	0,8±0,2 ^c

Legenda: Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

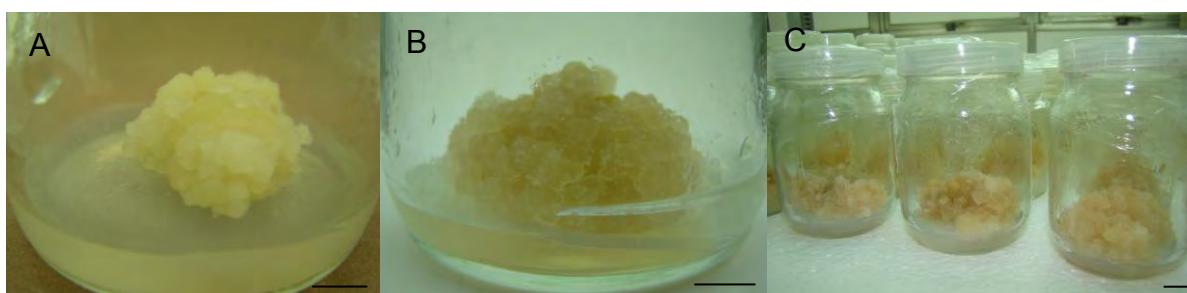
6.4.3 Manutenção da cultura de calos

Calos produzidos a partir de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, em meio suplementado com 1 mg.L^{-1} PIC + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN, foram subcultivados para meio de igual composição por sucessivas subculturas.

Calos com 90 dias de cultivo foram subcultivados com um inóculo inicial de, aproximadamente, PF = 6g, e após 30 dias o PF atingiu cerca de 25 g (Figuras 43A, 50B). A coloração dos calos variou de branca a bege clara, e a consistência permaneceu friável (Figura 43C).

Os calos foram subcultivados por pelo menos dois anos, mantendo elevada capacidade de produção de biomassa, constituindo um estoque de material biotecnológico para posteriores análises fitoquímicas.

Figura 43 - Manutenção da cultura de calos de *Cleome dendroides* em meio MS + 1 mg.L^{-1} PIC + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN.



Legenda: A - Inóculo inicial (PF = 6 g); B - Aumento de biomassa, após 30 dias em cultura (PF = 25g); C - Calos subcultivados mensalmente, após 6 meses em cultura. Barras: 1 cm.

6.4.4 Estabelecimento da cultura de células em suspensão (CCS)

Calos friáveis, produzidos a partir de plântulas oriundas de germinação *in vitro*, com 90 dias de cultivo em meio suplementado com 1 mg.L^{-1} PIC + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN, foram selecionados para iniciar a cultura de células em suspensão.

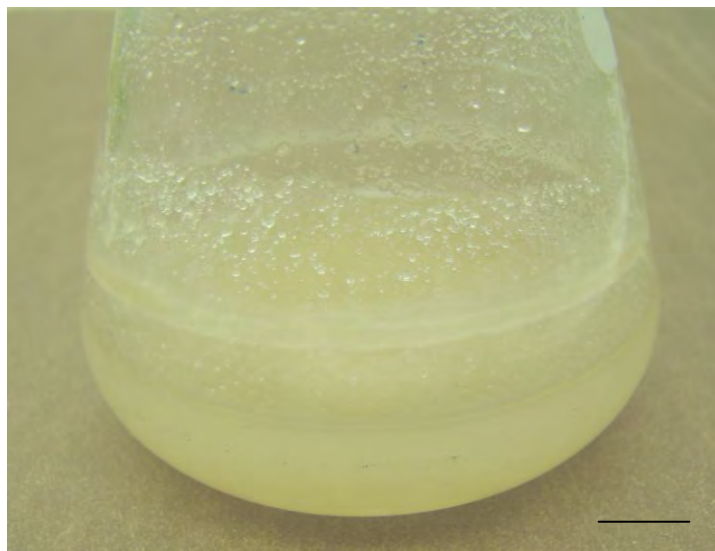
Para avaliar a quantidade de inóculo mais adequado para o início da CCS, testou-se 2, 3 e 4 g de massa calogênica.

Após 19 dias, observou-se um crescimento intenso das culturas, determinando-se como finalizado o experimento. Nesta fase, as culturas iniciadas com inóculos de 2 e 3 g apresentavam-se com coloração bege clara (Figura 44). As culturas iniciadas com 4 g de inóculo tornaram-se bege escuras por volta de 14 dias após o início do experimento.

O tamanho do inóculo influenciou significativamente o aumento de PF e de PS das CCS. As culturas iniciadas com o menor valor de inóculo (2 g) tiveram um maior crescimento (PF - 388,72% e PS - 249,45%, ou seja, cerca de 5 vezes e 3,5 vezes, respectivamente) (Tabela 29).

Durante a avaliação da viabilidade celular, utilizando-se o teste topográfico de tetrazólio, verificou-se que as culturas iniciadas com 2 e 3 g mantiveram-se viáveis, enquanto as iniciadas com 4 g perderam a viabilidade.

Figura 44 - Cultura de células em suspensão de *Cleome dendroides* em meio com 1 mg.L⁻¹ PIC + 0,1 mg.L⁻¹ KIN, após 19 dias de inoculação de 2 g de calo friável.



Nota: Barra: 1 cm.

Tabela 29 - Avaliação do tamanho do inóculo para o estabelecimento da cultura de células em suspensão de *Cleome dendroides*, após 19 dias em meio líquido MS + 1 mg.L⁻¹ PIC + 0,1 mg.L⁻¹ KIN.

Inóculo	Peso de Matéria Fresca (g)		Aumento do PF (%)	Peso de Matéria Seca (g)		Aumento do PS (%)	Viabilidade
	Inicial	Final		Inicial	Final		
2g	2,04±0,07	9,97±1,56	388,72 ^a	0,09±0,001	0,33±0,05	249,45 ^a	+
3g	3,08±0,08	12,29±2,36	299,02 ^b	0,14±0,002	0,32±0,03	125,48 ^b	+
4g	3,95±0,05	13,09±0,58	231,39 ^c	0,17±0,004	0,41±0,02	134,81 ^b	-

Legenda: PF - peso de matéria fresca; PS - peso de matéria seca.

Médias ± erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.4.5 Curva de crescimento

Os dados de peso de matéria fresca e de matéria seca das CCS foram utilizados para a construção de uma curva de crescimento em função do tempo de cultivo. O crescimento das CCS apresentou estádios conforme apresentado na Figura 45.

A fase lag ocorreu até o 3º dia com ausência de crescimento de PF e de PS. Nesta fase, as células adaptam-se ao meio de cultura e preparam-se para a divisão celular.

O período de crescimento exponencial ficou caracterizado entre o 3º e o 7º dia, alcançando um percentual de crescimento de aproximadamente 50%. Nesta fase, as células encontram-se em crescimento ativo, com metabolismo acelerado, quando ocorre o máximo de divisão celular.

A fase linear ocorreu entre o 7º e o 9º dia, alcançando cerca de 275% de crescimento de PF e 225% de PS.

O período de desaceleração do crescimento foi do 9º ao 12º dia, quando a CCS entrou na fase estacionária, que durou do 12º ao 16º dia. Durante a fase estacionária há um maior número de células com menor capacidade de divisão celular, e geralmente, ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários.

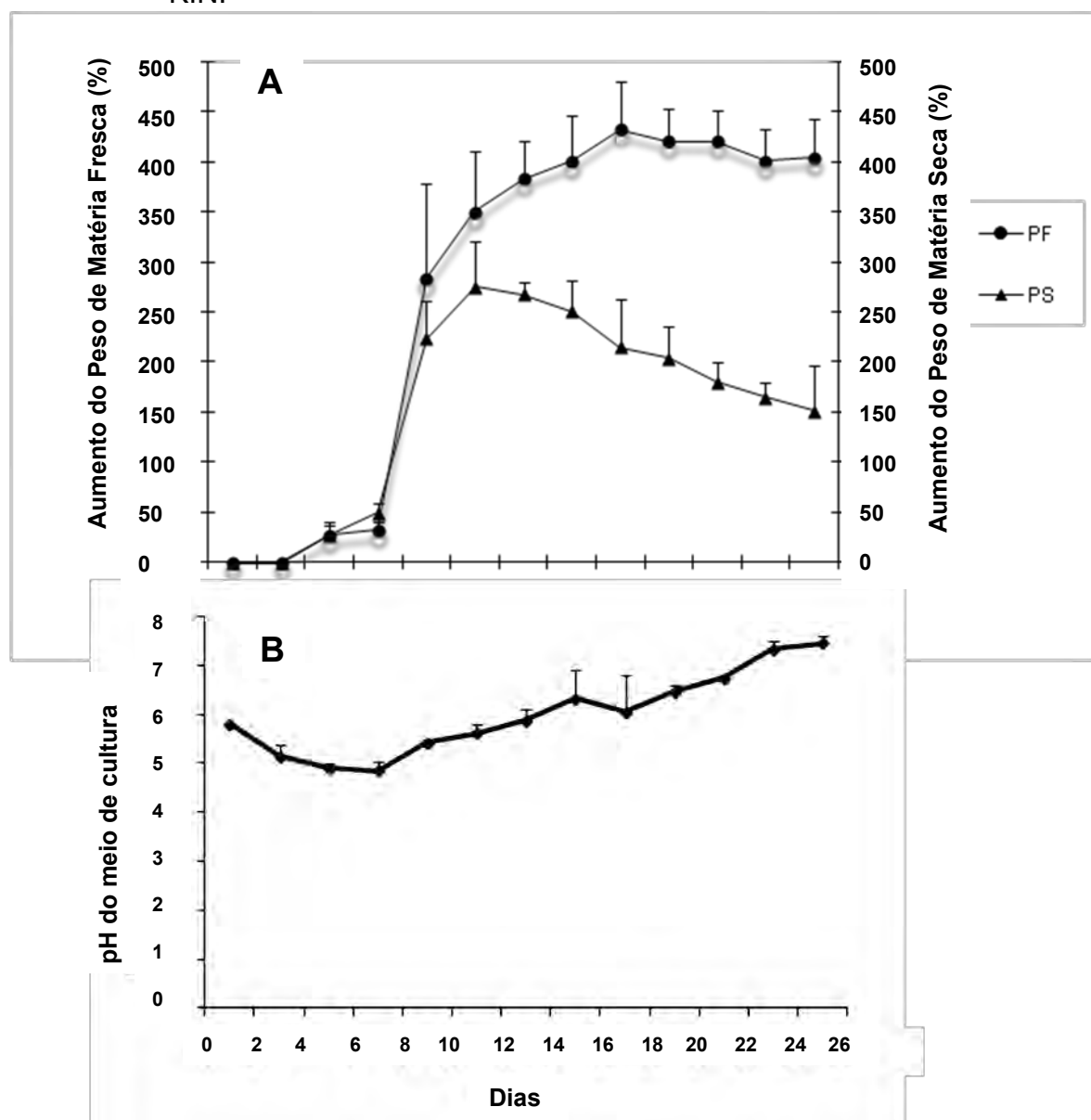
Por volta do 15º dia, a matéria fresca aumentou cerca de 5 vezes em relação à quantidade de inóculo inicial, enquanto a matéria seca aumentou cerca de 4 vezes.

As culturas eram homogêneas e possuíam rápido crescimento, de aspecto denso e compostas por aglomerados celulares e por células livres.

Durante toda a cultura, houve o monitoramento da viabilidade celular. As células mantiveram-se viáveis até o 25º dia, sendo que a partir do 26º dia o teste topográfico de tetrazólio deu negativo, indicando células inviáveis.

O pH do meio de cultura permaneceu constante, por volta de 5,0, durante os sete primeiros dias de cultivo. Após este período, quando a cultura entrou na fase linear, notou-se um aumento progressivo no pH até o 14º dia. O pH se estabilizou entre o 15º e o 16º dia, período de transição entre fase estacionária e fase de declínio do crescimento da cultura. Após isso, o pH voltou a aumentar progressivamente, alcançando um máximo de 7,45 ao fim do experimento (26 dias).

Figura 45 - Curva de crescimento da cultura de células em suspensão de *Cleome dendroides*, em meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} PIC + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN.



Legenda: Variação de peso de matéria fresca e seca (A) e variação do pH (B) ao longo do período de cultivo. PF - Peso de Matéria Fresca; PS - Peso de Matéria Seca.

6.4.6 Manutenção da cultura de células em suspensão

Após a definição da curva de crescimento, o subcultivo das CCS passou a ser realizado no 15º dia de cultivo, quando as culturas encontravam-se na fase estacionária de crescimento.

As CCS foram filtradas a vácuo e cerca de 2 g de células foram inoculados em meio de cultura fresco, de igual composição, durante três subculturas. Observou-

se que as CCS foram capazes de manter a produção de biomassa durante as subculturas, sem diferença significativa entre elas. O aumento de peso de matéria fresca alcançou 394,56%, ou seja, cerca de cinco vezes o PF inicial (Tabela 30).

A metodologia mostrou-se eficiente na manutenção das CCS por diferentes subculturas (Figura 46).

Figura 46 - Cultura de células em suspensão de *Cleome dendroides*, em meio MS suplementado com 1 mg.L^{-1} PIC + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN, após 15 dias de cultivo.



Nota: Barra: 1 cm.

Tabela 30 - Manutenção das culturas de células em suspensão de *Cleome dendroides* durante três subculturas.

Subcultura	Peso de Matéria Fresca Inicial (g)	Peso de Matéria Fresca Final (g)	Aumento de Peso de Matéria Fresca (%)
1 ^a	$1,94 \pm 0,08^a$	$8,55 \pm 0,49^a$	$339,84 \pm 18,06^a$
2 ^a	$2,03 \pm 0,09^a$	$9,97 \pm 1,56^a$	$394,56 \pm 97,81^a$
3 ^a	$1,99 \pm 0,06^a$	$9,70 \pm 1,24^a$	$387,44 \pm 35,00^a$

Legenda: Médias \pm erro padrão nas colunas seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.4.7 Análise histoquímica

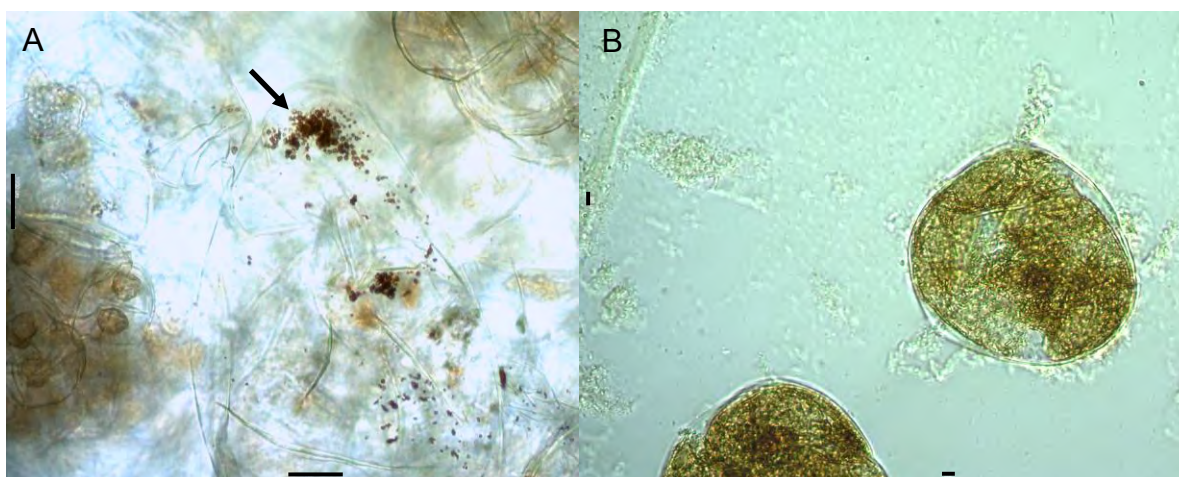
Este experimento objetivou avaliar a presença de algumas classes de substâncias químicas nas culturas de calos e de células em suspensão.

Durante a análise microscópica das culturas sem reagentes químicos, observaram-se células de formato esférico e de formato cilíndrico. Nas CCS, as células encontravam-se isoladas ou formando agregados.

Quando se avaliou os dois tipos de cultura, verificou-se a presença no citoplasma das células de conteúdo lipídico corado com Sudan III (Figura 47A).

Nas reações para avaliação de alcaloides, observou-se a formação de precipitado castanho-alaranjado nos vacúolos celulares, indicando a presença desta classe de substâncias químicas tanto em calos, quanto nas CCS (Figura 47B).

Figura 47 - Análise histoquímica de calos e cultura de células em suspensão de *Cleome dendroides*, em meio MS com 1 mg.L^{-1} PIC + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN, após 30 e 19 dias em cultura, respectivamente.



Legenda: A - Células de calos apresentando conteúdo lipídico corado com Sudan III (seta); B - Identificação de alcaloides pelo Reagente de Dragendorff em cultura de células em suspensão (B). Barras: A - $1000 \mu\text{m}$; B - $80 \mu\text{m}$.

6.4.8 Análise fitoquímica

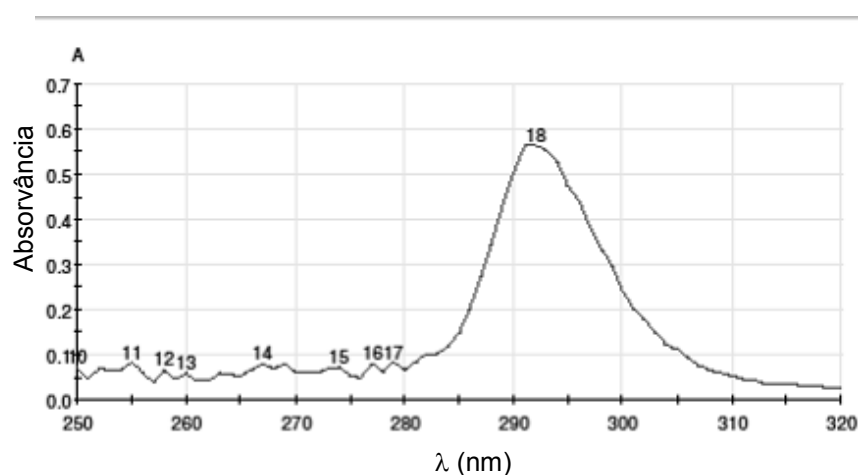
Após ser verificada a presença de alcaloides tanto em calos, quanto nas CCS, realizaram-se análises fitoquímicas com o objetivo de identificar a(s) substância(s).

Após extração ácido-básica realizada nas amostras de calos (Tabela 31), o extrato foi analisado em espectrofotômetro resultando em um espectro de varredura com pico de máxima absorvância em 292 nm (Figura 48). Na análise em cromatografia em camada delgada, o reagente de Dragendorff revelou uma banda de coloração castanha, indicando a presença de alcaloide.

Tabela 31 - Rendimento da extração ácido-básica realizada em amostras de calos de *Cleome dendroides*.

Amostra	Peso de Matéria Fresca (g)	Peso de Matéria Seca (g)	Rendimento da extração (mg)
Calo	651,09	22,11	37,5

Figura 48 - Análise espectrofotométrica de extrato de calo de *Cleome dendroides*.

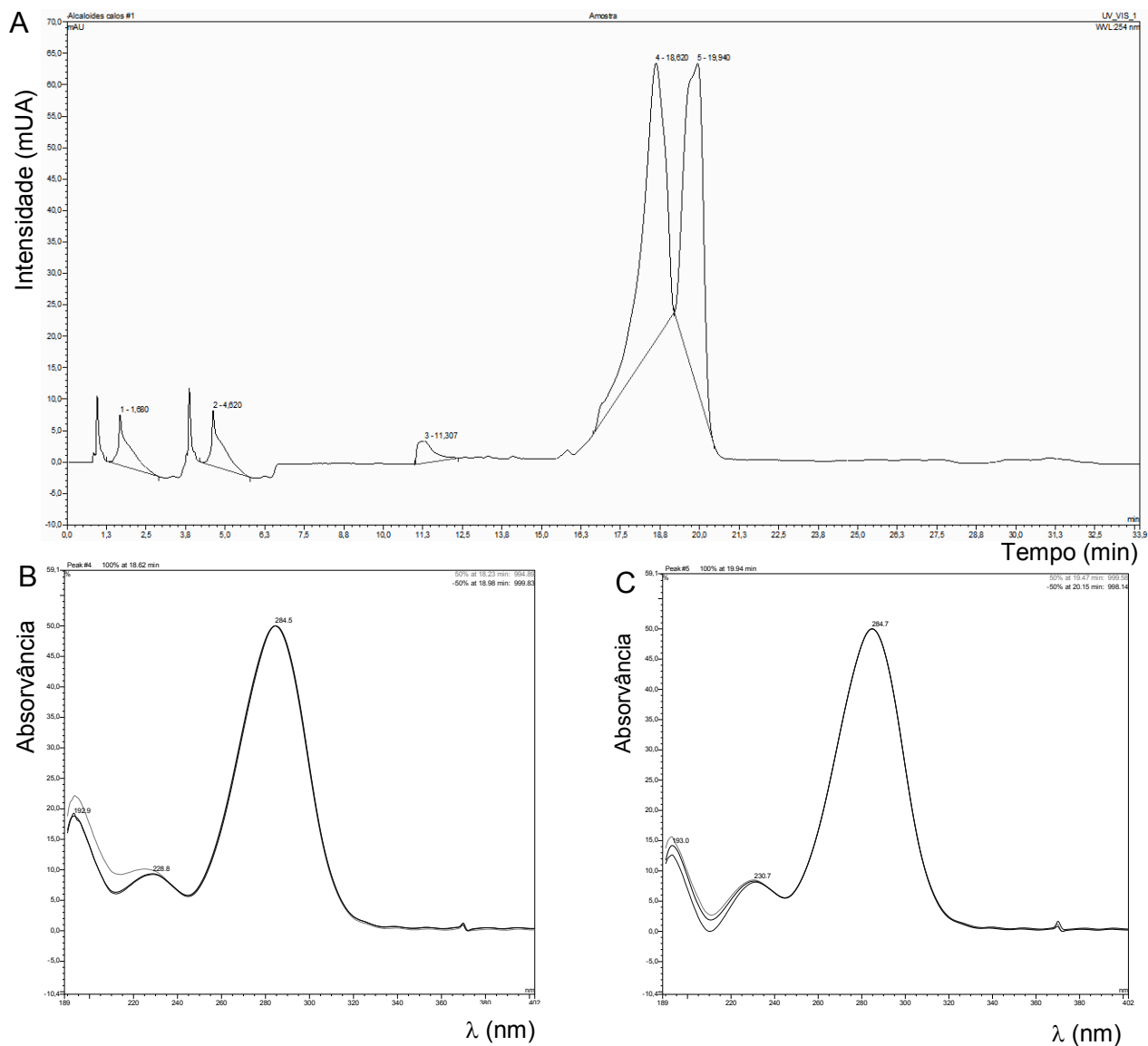


A análise por cromatografia líquida de alta eficiência indicou a presença de pelo menos duas substâncias majoritárias presentes na amostra (Figura 49 A). Os dois sinais majoritários, com tempos de retenção 18,620 min e 19,940 min, apresentavam absorvâncias máximas a 284,5 e 284,7 nm, respectivamente, com perfil muito semelhante (Figuras 49 B, 56 C).

6.4.9 Análise de glicosinolatos

Não foi constatada a produção de glicosinolatos nos sistemas *in vitro* avaliados, a saber, as culturas de calos e de células em suspensão.

Figura 49 - Análise cromatográfica por CLAE de extrato de calo de *Cleome dendroides*.



Legenda: A - cromatograma; B - espectro de UV a 254 nm do sinal 4 ($T_r = 18,620$ min) ($\lambda_{\max} = 284,5$ nm); C - espectro de UV a 254 nm do sinal 5 ($T_r = 19,940$ min) ($\lambda_{\max} = 284,7$ nm).

6.5 Discussão

As culturas de calo e de células em suspensão são técnicas de cultura de tecidos vegetais que representam um método viável para a produção contínua de biomassa com o objetivo principal de produção de metabólitos de interesse.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que foi alcançado, com sucesso, o estabelecimento das culturas de calos e de células em suspensão de *Cleome dendroides*. Os protocolos foram eficientes, permitindo uma produção de biomassa adequada, podendo atender a diversas demandas.

Os reguladores de crescimento suplementados ao meio de cultura são um dos fatores que mais afetam o crescimento celular, a diferenciação, a regeneração e a formação de metabólitos nas culturas (CALDAS et al., 1998). Para os experimentos de indução de calogênese, no presente trabalho, foram utilizados como reguladores de crescimento auxinas isoladas ou em combinação com a citocinina KIN. As auxinas possuem papel regulador do crescimento e do desenvolvimento vegetal e em nível celular, controlam a divisão e o alongamento celular. Estão envolvidas na desdiferenciação celular, dando origem a culturas não organizadas, bem como envolvidas na indução de morfogênese, como o enraizamento. Logo, as diferentes auxinas podem produzir respostas morfogênicas diversas. A escolha do tipo e da concentração da auxina depende da resposta morfogênica desejada e da concentração hormonal endógena, dentre outros fatores. (CID, 2010; GEORGE et al., 2008).

As auxinas desempenham um papel importante na indução de calos. Para tal, em geral, são necessárias concentrações mais elevadas deste fitorregulador, quando comparado à indução de rizogênese. Porém, isto depende da potência da substância. Assim, o 2,4-D e o PIC são mais potentes do que o AIA e o ANA (CID, 2010). Essa afirmativa é confirmada pelos resultados obtidos neste trabalho. Calogênese foi mais eficientemente induzida nos meios de cultura suplementados com PIC e 2,4-D, nos diferentes explantes testados, em ambas as origens.

Por vezes, o regulador de crescimento para indução de calos pode variar entre espécies do mesmo gênero. Porém, culturas de calos de outras espécies do gênero *Cleome* também foram obtidas em meio MS suplementado com PIC e 2,4-D. Calos de *C. spinosa* produtores de carotenoides desenvolveram-se em meio com

0,1 a 1 mg.L⁻¹ PIC ou 2,4-D, a partir de explantes de caule de plantas axênicas (ALBARELLO et al., 2007).

Esses reguladores de crescimento também foram eficientes na produção de calos de *C. rosea* produtores de antocianinas. Os calos foram obtidos a partir de explantes caulinares e foliares de plantas axênicas, em meio MS suplementado com 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹ 2,4-D ou PIC (SIMÕES et al., 2009b).

Em outro estudo com *C. rosea*, calos produtores de carotenoides foram obtidos a partir de explantes internodais de plantas propagadas *in vitro*. Neste trabalho, além do meio básico MS, foram avaliados os meios B5 (GAMBORG et al., 1968), Nitsch (NITSCH; NITSCH, 1969) e White (WHITE, 1934), com as concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10;0 mg L⁻¹ PIC ou 2,4-D. Em todos os tratamentos foi obtida calogênese (ROCHA et al., 2013).

A auxina mais indicada para iniciar cultura de calos, segundo a literatura, é o 2,4-D. Porém, sabe-se que algumas culturas mantidas em 2,4-D apresentam variação somaclonal (GEORGE et al., 2008). Assim sendo, foram testadas, além do do 2,4-D e PIC, as auxinas AIA e ANA.

Explantes foliares e radiculares, de ambas as origens, inoculados em meio com AIA e ANA apresentaram preferencialmente rizogênese. Em explantes hipocotiledonares ou caulinares, cauligênese foi a resposta preponderante, mas também apresentaram rizogênese e calogênese na base. Para *C. rosea*, Simões e colaboradores (2009) observaram que a presença de ANA induziu rizogênese em explantes foliares e caulinares, enquanto AIA induziu regeneração de brotos em explantes caulinares, sem resposta morfogênica em folhas.

Muitos estudos têm reportado que as auxinas atuam como o mais importante fator de indução de calos, e que as citocininas facilitam seu efeito (JAYANTHI; MANDAL, 2001; ROSTAMPOUR et al., 2010). Segundo George e colaboradores (2008), em cultura de calos, geralmente, uma citocinina é adicionada ao meio de cultura em combinação com auxina. Desta forma, avaliamos a combinação das auxinas com a citocinina KIN para a produção de calos de *C. dendroides*.

A adição de KIN não alterou significativamente, nem as porcentagens de respostas morfogênicas, nem os pesos de matéria fresca e seca, na maioria das variáveis testadas (origem e tipo do explante, regulador de crescimento). Apesar de relatos na literatura sobre redução significativa na produção de calos devido à utilização da combinação entre auxina e citocinina (TAN et al., 2010), este tipo de

suplementação ao meio de cultura não foi prejudicial às culturas no presente trabalho.

Estudo biotecnológico com outra espécie de *Cleome*, *C. chelidonii*, foi desenvolvido, produzindo-se cultura de calos a partir de plantas axênicas, sendo também utilizada a combinação de uma auxina com uma citocinina suplementada ao meio MS (MS + 1 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ KIN) (SONGSAK; LOKWOOD, 2004).

Diversas partes das plantas podem servir como explante, pois possuem potencial para se desdiferenciar formando calos, como folha, hipocótilo, raiz, meristema isolado. A seleção do explante a ser usado depende da espécie (GEORGE et al. 2008; LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA 2006). No presente estudo, os diferentes explantes testados, de ambas as origens, responderam ao estímulo das auxinas, possuindo células competentes, tanto para se desdiferenciar e formarem calos, quanto para formarem novos órgãos.

O tipo de explante definiu o padrão de morfogênese nos meios suplementados com as auxinas AIA e ANA. Nestes meios, em geral, em explantes de caule foi induzida cauligênese, enquanto em explantes de folha e raiz, rizogênese. Em meios com PIC e 2,4-D, auxinas mais potentes, o regulador de crescimento definiu a resposta morfogênica, sendo que todos os explantes, de ambas as origens, apresentaram preferencialmente calogênese, com produção de calos friáveis.

Nos meios com PIC e 2,4-D, os resultados de peso de matéria fresca e seca dos calos obtidos com as duas origens (plântulas oriundas de germinação *in vitro* e plantas mantidas em estoque *in vitro*) indicam que o fator origem influenciou a produção de massa calogênica. Explantes provenientes de plântulas oriundas de germinação *in vitro* produziram calos com maiores PF e PS. Possivelmente, o balanço hormonal endógeno combinado com a suplementação de auxina exógena tenha favorecido à produção de biomassa.

No presente estudo, o acúmulo de biomassa foi mais elevado em explantes de caule e folha, de ambas as origens, inoculados em meios suplementados com PIC e 2,4-D, isolados ou em combinação com KIN. Para *C. rosea*, a maior produção de massa calogênica foi obtida a partir de explantes de caule, em meios com 0,2 mg.L⁻¹ 2,4-D, após 60 dias de cultivo (ROCHA et al., 2013; SIMÕES et al., 2009b).

Diante dos resultados, optou-se por fazer a manutenção da cultura de calos provenientes de explantes de plântulas oriundas de germinação *in vitro* em meio

suplementado com PIC + KIN. O uso de explantes de plântulas oriundas de germinação *in vitro* se justifica em função da maior produção de massa calogênica quando comparado às plantas mantidas em estoque *in vitro*, além disso, optou-se por utilizar o meio MS suplementado com PIC em detrimento do meio com 2,4-D, pelo fato da auxina PIC ter induzido apenas calogênese nos diferentes tipos de explantes. Além do fato de que calos que são mantidos em meios com 2,4-D podem vir a apresentar variação somaclonal (GEORGE et al., 2008). Somado a isso, existem relatos de inibição da produção de metabólitos secundários provocada por este regulador de crescimento (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

A manutenção da cultura de calos foi realizada por pelo menos dois anos, com elevada produção de biomassa, disponibilizando material para estudos fitoquímicos e farmacológicos.

Para o estabelecimento da cultura de células em suspensão foram utilizados calos friáveis produzidos a partir de explantes de plântulas oriundas de germinação *in vitro*. As CCS foram mantidas em meio com composição igual àquele usado nas culturas de calos (meio MS +1 mg.L⁻¹ PIC + 0,1 mg.L⁻¹ KIN).

Como a cultura de células em suspensão estabelecida foi do tipo "batch culture", onde o volume do meio de cultura é finito, as fases características do crescimento foram observadas na curva de crescimento: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio. Na fase lag não ocorre divisão celular, apenas mobilização de nutrientes. Em seguida, as fases exponencial e linear são caracterizadas por intensa divisão celular, com aumento de biomassa. As fases de desaceleração e estacionária representam a redução na divisão celular, e, por fim, a fase de declínio, quando as células morrem (GUERRA; NODARI, 2006).

Um dos fatores importantes para o estabelecimento de uma CCS é o inóculo. O inóculo mínimo para começar uma CCS depende do genótipo da planta (GEORGE et al., 2008). Deve-se observar que a densidade do inóculo afeta o comprimento da fase lag, sendo esta maior, quanto menor a quantidade inicial de células (GUERRA; NODARI, 2006). Para *C. dendroides*, o menor valor de inóculo testado (2 g) foi o que promoveu maior crescimento da cultura, com uma fase lag curta, de três dias. Em estudos com *C. rosea*, o inóculo utilizado foi de 3 g para erlenmeyers de 125 mL (SIMÕES-GURGEL et al., 2011) e foi de 1,5 g para erlenmeyers de 50 mL (ROCHA et al., 2013).

No presente trabalho, as CCS estabelecidas em meio MS +1 mg.L⁻¹ PIC + 0,1 mg.L⁻¹ KIN, alcançaram cerca de cinco vezes o PF inicial. Para *C. rosea*, CCS foram estabelecidas em meio MS + 0,2 mg.L⁻¹ 2,4-D, sendo que culturas produtoras de antocianinas obtiveram um aumento de quatro vezes a biomassa (SIMÕES-GURGEL et al., 2011), enquanto culturas produtoras de carotenoides, duas vezes, durante a terceira subcultura (ROCHA et al., 2013).

O monitoramento do pH das CCS, durante a curva de crescimento, demonstrou um aumento contínuo deste parâmetro, indicando que o consumo de nutrientes e a produção de metabólitos foram progressivos durante todo o tempo da cultura. Não houve alteração expressiva em alguma fase específica da cultura, como foi observado por Celedón e colaboradores (2000) em CCS de algodoeiro, onde as maiores alterações de pH ocorreram durante a fase exponencial do crescimento da cultura. Eles afirmaram que isso foi reflexo do maior consumo de nutrientes pelas células nesta fase.

Para a manutenção das CCS, foram realizadas subculturas a cada 15 dias, quando as culturas encontravam-se na fase estacionária de crescimento. Neste período, as culturas devem ser transferidas para meio fresco devido à redução dos nutrientes do meio, à produção de substâncias tóxicas e à redução do oxigênio. Durante três subculturas sucessivas, a produção de biomassa foi mantida, sem diferença significativa, mantendo-se cerca de cinco vezes o PF inicial. Este tipo de resposta também foi obtido para CCS de *C. rosea* que mantiveram o PF e o PS durante seis sucessivas subculturas (SIMÕES-GURGEL et al., 2011).

Durante a fase estacionária ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários nas CCS. Isto é explicado, pois nas fases de crescimento ativo da cultura, o carbono é requerido principalmente pelo metabolismo primário. Quando o crescimento diminui ou cessa, o carbono passa a ser alocado no metabolismo secundário. No entanto, alguns metabólitos secundários têm a sua produção associada ao crescimento celular, como antocianinas, betalaínas e carotenoides (AKITA et al., 2000; LEATHERS et al., 1992; ROCHA et al., 2013; SIMÕES-GURGEL et al., 2011). Como os calos de *C. dendroides* não possuíam qualquer tipo de pigmento, optou-se pela realização das análises histoquímicas das CCS na fase estacionária de crescimento da cultura.

Para as culturas de calos, levou-se em consideração que o estabelecimento de calos a partir de explantes pode ser dividido em três fases: indução, divisão

celular e diferenciação. Durante a indução, as células se preparam para a divisão. Em seguida, durante a fase ativa de divisão celular ocorre a desdiferenciação. E por fim, a terceira fase pode envolver o aparecimento de diferenciação celular e produção de metabólitos secundários (GEORGE et al., 2008). Assim sendo, foi realizada a análise de metabólitos quando os calos já estavam estabelecidos, após 30 dias de subcultura.

Uma vez que, como regra geral, o metabolismo secundário está intimamente correlacionado com a diferenciação celular (MARASCHIN; VERPOORTE, 2000), e em muitos casos a síntese e estocagem de metabólitos ocorre em compartimentos individuais altamente especializados (DÖRNENBURG; KNORR, 1995), como por exemplo, as células S, a ausência de organização tecidual nas culturas de calos e de células em suspensão pode ter influenciado negativamente a produção de glicosinolatos.

Outra possibilidade da ausência da produção de glicosinolatos nos calos e nas CCS seria a não produção da enzima mirosinase. Apesar de já ter sido detectada atividade de mirosinase em cultura de calos, além de plantas cultivadas *in vitro* (BONES; ROSSITER, 1996).

Em espécie do próprio gênero *Cleome*, *C. chelidonii*, além de *Nasturtium montanum*, da família Brassicaceae, Songsak e Lockwood (2004) já verificaram a presença de derivados de glicosinolatos (metil isotiocianato e indolacetoneitrila, respectivamente para cada espécie) em cultura de calos e de células em suspensão, após a hidrólise com mirosinase endógena. Um futuro experimento com a utilização de mirosinase exógena para a hidrólise de possível (is) glicosinolato (s) pode vir a dirimir qualquer dúvida.

Tendo em vista a ausência de resultados positivos para a presença de glicosinolatos tanto em culturas de calos quanto de células em suspensão (dados não mostrados), optou-se pela avaliação de outra classe de metabólitos, também nitrogenados, e de grande relevância medicinal, os alcaloides.

A presença de alcaloides foi reportada em diferentes espécies de *Cleome*. Análises fitoquímicas indicam a produção de alcaloides em frutos e flores de *C. spinosa* (BULHÕES et al., 1976), em folhas, raízes e frutos de *C. viscosa* (DHOLE et al., 2012; GAYATHRI DEVI et al., 2013), em partes aéreas e raízes de *C. chelidonii* (GANGA RAO et al., 2011), em folhas, caules e sementes de *C. rutidosperma* (ARHOGHRO et al., 2014; EDEOGA et al., 2005; NWAOGU; UDEBUANI, 2010;

OJIAKO; IGWE, 2007; OKORO et al., 2015), em *C. gynandra* (NARENDHIRAKANNAN et al., 2005) e em *C. africana* (AL-YAHYA et al., 1983).

As análises histoquímicas indicaram a presença de alcaloides em ambas as culturas de *C dendroides*. Estudos preliminares realizados com extratos metanólicos de folha e caule de campo (dados não mostrados) indicaram a presença de alcaloides pela formação de precipitado branco em presença do reagente de Mayer (COSTA, 2000). Desta forma, foram realizadas análises fitoquímicas com o intuito de identificação das substâncias.

A avaliação do rendimento da extração ácido-básica em amostras de calo demonstrou uma produção de 0,06 mg de alcaloides totais / g de peso de matéria fresca ou 1,7 mg de alcaloides totais / g de peso de matéria seca. Para *C. chelidonii*, o conteúdo de alcaloides totais variou entre 5 e 33 mg / g de partes aéreas e raízes de plantas coletadas em duas localidades diferentes da Índia (GANGA RAO et al., 2011), enquanto, para plantas de campo de *C. rutidosperma*, Edeoga e colaboradores (2005) obtiveram 0,34% de alcaloides totais em folhas e caules.

No presente trabalho, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência indicou a presença de pelo menos duas substâncias majoritárias com tempos de retenção muito próximos (18,620 min e 19,940 min), o que não permitiu a resolução total dos sinais em diversas condições testadas. Os espectros de varredura dos dois sinais apresentaram absorvâncias máximas a 284,5 e 284,7 nm, com perfis muito semelhantes. Diante dos resultados, infere-se que as substâncias podem tratar-se de isômeros.

Existem apenas dois relatos sobre isolamento e identificação de alcaloides na família Cleomaceae. O alcaloide paradoxonina (6-ethy-6-methylmorpholine-3-one) e seu tautômetro (isômero), paradoxenolina (6-ethyl, 6-methyl-5,6-dihydro-4H-1,4-oxazin-3-ol) foram isolados a partir da planta inteira de *C. paradoxa* (ABDEL-MONEM, 2012).

Em partes aéreas de *C. droserifolia*, foi identificado um alcaloide indólico denominado 5-hydroxy-2-methoxy-1-methyl-1H-indole-3-carbaldehyde (HUSSAIN et al., 2015).

Este é o primeiro trabalho sobre estabelecimento de cultura de calos e de células em suspensão produtoras de alcaloides no gênero *Cleome*.

6.6 Conclusões

- ❖ O estabelecimento da cultura de calos foi eficientemente alcançado a partir de plântulas obtidas por germinação *in vitro*, em meio MS suplementado com PIC (1 mg.L^{-1}) isolado ou em combinação com KIN ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$);
- ❖ O uso de 2 g de calos friáveis foi definido como o inóculo adequado ao estabelecimento das culturas de células em suspensão em meio MS com 1 mg.L^{-1} PIC + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN;
- ❖ Os protocolos propostos mostraram-se eficientes na manutenção das culturas de calos e de células em suspensão por longo período, com elevada produção de biomassa e produção de alcaloide;
- ❖ Duas substâncias majoritárias com tempos de retenção muito próximos e espectros de varredura com perfis muito semelhantes, possivelmente isômeros, estavam presentes nos sistemas estabelecidos.

CONCLUSÕES FINAIS

- ❖ Temperaturas entre 20 e 30°C, fixas ou alternadas, favoreceram a germinação *in vivo* de sementes de *Cleome dendroides* em todos os substratos testados, contudo as condições definidas para a germinação *in vitro* permitiram um desenvolvimento das plântulas mais rápido para uso em experimentos de cultura de tecidos vegetais;
- ❖ O uso de plântulas obtidas por germinação *in vitro* e do meio MS sólido suplementado com BA, independentemente do tipo de explante, resultou em um protocolo eficiente de produção de plantas *in vitro*, por organogênese direta, que foram mantidas em meio MS0 durante sucessivas subculturas, servindo como fonte de explantes para outros protocolos de cultivo *in vitro*;
- ❖ Explantes radiculares foram eficientes no estabelecimento por organogênese direta da cultura de raízes, em meio líquido contendo AIB e posteriormente na regeneração de brotos, em meio com BA, mantendo a capacidade morfogênica durante sucessivas subculturas;
- ❖ A suplementação com PIC isolado ou em combinação com KIN viabilizou a elevada produção de biomassa e produção de alcaloides em culturas de calos e de células em suspensão;
- ❖ Existem indicativos de que glicosinolatos, marcadores químicos do gênero *Cleome*, estavam presentes tanto em amostras de planta de campo, quanto de plantas aclimatizadas, de plantas *in vitro* e de culturas de raízes.

PERSPECTIVAS

- ❖ Otimizar a cultura de raízes a partir de plantas micropropagadas;
- ❖ Avaliar a utilização de um aminoácido aromático (fenilalanina ou tirosina) como precursor na cultura de raízes visando à otimização da produção de glicosinolatos;
- ❖ Identificar os alcaloides presentes nas culturas de calos e de células em suspensão utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas;
- ❖ Avaliar a utilização de mirosinase exógena em cultura de calos e de células em suspensão visando à produção de glicosinolatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-KADER, M.S., ALQASOUMI, S.I., AL-TAWEEL, A.M. Hepatoprotective constituents from *Cleome droserifolia*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.57, n.6, p.620-624, 2009.
- ABDEL-MONEM, A.R. A new alkaloid and a new diterpene from *Cleome paradoxa* B.Br. (Cleomaceae). **Natural Product Research**, v.26, n.3, p.264-269, 2012.
- ABOUZID, S.F., EL-BASSUONY, A.A., NASIB, A., KHAN, S., QURESHI, J., CHOUDHARY, M.I. Withaferin A production by root cultures of *Withania coagulans*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.3, n.1, p.23-27, 2010.
- ADELBERG, J. Plant growth and sugar utilization in an agitated, thin-film liquid system for micropropagation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.40, p.245–250, 2004.
- AGARWAL, M., KAMAL, R. Studies on flavonoid production using *in vitro* cultures of *Momordica charantia* L. **Indian Journal of Biotechnology**, v.6, p.277-279, 2007.
- AGRA, M.F., FREITAS, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.
- AHMAD, V.U., ALVI, K.A. Deacetoxybrachycarpone, a trinortriterpenoid from *Cleome brachycarpa*. **Phytochemistry**, v.26, n.1, p.315-316, 1987.
- AHMAD, V.U., ALVI, K.A., KHAN, M.A. The molecular structure and absolute configuration of brachycarpone, a new trinortriterpenoid dilactone from *Cleome brachycarpa*. **Journal of Natural Products**, v.49, n.2, p.249-252, 1986.
- AHMAD, V.U., QAZI, S., ZIA, N.B., XU, C., CLARKY, J. Cleocarpone, a triterpenoid from *Cleome brachycarpa*. **Phytochemistry**, v.29, n.2, p.670-672, 1990.
- AHMED, A.A., KATTAB, A.M., BODIGE, S.G., MAO, Y., MINTER, D.E., REINECKE, M.G., WATSON, W.H., MABRY, T.J. 15alpha-acetoxycleomblynnol A from *Cleome amblyocarpa*. **Journal of Natural Products**, v.64, n.1, p.106-107, 2001.
- AHMED, S., SULTANA, M., HASAN, M.M.U., AZHAR, I. Analgesic and antiemetic activity of *Cleome viscosa* L. **Pakistan Journal of Botany**, v.43, p.119-122, 2011.
- AHMED, Z.F., RIZK, A.M., HAMMOUDA, F.M. SEIF EL-NASR, M.M. Naturally occurring glucosinolates with special reference to those of family Capparidaceae. **Planta Medica**, v.21, n.1, p.35-60, 1972.
- AJAIYEGBA, E.O. Phytochemical and antimicrobial studies of *Gynandropsis gynandra* and *Buchholzia coriacea*. **African Journal of Biomedical Research**, v.3, p.161–165, 2000.
- AKITA, T., HINA, Y., NISHI, T. Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Bioscience Biotechnology, and Biochemistry**, v.64, p.1807–1812, 2000.
- ALBARELLO, N., RIBEIRO, I.G., SIMÕES, C., CASTRO, T.C., GIANFALDONI, M.G., CALLADO, C.H., KUSTER, R.M., COELHO, M.G.P., MANSUR, E. Histological analysis of calluses from *in vitro* propagated plants of *Cleome spinosa* Jacq. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.699-701, 2007.

- ALBARELLO, N., SIMÕES, C., ROSAS, P.F.G, CASTRO, T.C., GIANFALDONI, M.G.P., CALLADO, C.H., MANSUR, E. *In vitro* propagation of *Cleome spinosa* (Capparaceae) using explants from nursery-grown seedlings and axenic plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.42, p.601-606, 2006.
- ALBARELLO, N., SIMÕES-GURGEL, C., CASTRO, T.C., GAYER, C.R.M., COELHO, M.G.P., MOURA, R.S., MANSUR, E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of fieldgrowth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, n.16, p.1043-1049, 2013.
- ALIKARIDIS, F., PAPADAKIS, D., PANTELIA, K., KEPHALAS, T. Flavonolignan production from *Silybium marianum* transformed and untransformed root cultures. **Fitoterapia**, v.71, p.379-384, 2000.
- ALMAGBOUL, A.Z., FAROUK, A., BASHIR, A.K., KARIM, A., SALIH, M. Antimicrobial activity of certain sudanese plants used in folkloric medicine. Screening of antibacterial activity - Part II. **Fitoterapia**, v.56, n.2, p. 103-109, 1985.
- AL-YAHYA, M.A., AL-MESHAL, I.A., MOSSA, J.S., KHATIBI, A., HAMMOUDA, Y. Phytochemical and biological screening of saudi medicinal plants: Part II. **Fitoterapia**, v.54, p.21-24, 1983.
- AMARAL, C.L.F., SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.30, p.55-59, 2003.
- AMBROSONE, C.B., MCCANN, S.E., FREUDENHEIM, J.L., MARSHALL, J.R., ZHANG, Y., SHIELDS, P.G. Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. **Journal of Nutrition**, v.134, n.5, p.1134-1138, 2004.
- ANBAZHAGAN, V.R., AHN, C.H., HARADA, E., KIM Y.S., CHOI, Y.E. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllum peltatum*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, n.44, p.494-501, 2008.
- ANBURAJ, J., SINGH, C.R., SUNDARRAJ, S., KANNAN, S. *In vitro* regeneration of *Cleome viscosa* – an important medicinal herb. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v.9, n.1, p.37-44, 2011.
- ANDREATA, R.H.P., LIMA, H.C., VAZ, A.S.F., BAUMGRATZ, J.F.A., PROFICE, S.R. Diversity and floristic composition of the vascular plants in the forest fragment in southeastern Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v.2, n.1, p.575-592. 2008.
- APARADH, V.T., MAHAMUNI, R.J., KARADGE, B.A. Taxonomy and physiological studies in spider flower (*Cleome species*): A critical review. **Plant Sciences Feed**, v.2, n.3, p.25-46, 2012.
- ARHOGHRO, E.M., BEREZI, E.P., PROHP, T.P. Phytochemical constituents and effect of combined ethanolic leaf extract of *Costus afer* and *Cleome rutidosperma* on lipid profile and some haematological parameters in wistar rats. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, n.5, p.673-679, 2014.
- ASPEREN, K.V. The determination of 4-methyl-2-thiouracil in animal blood, urine and faeces. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.6, p.187-191, 1950.

- BAIRU, M.W., AREMU, A.O., STADEN, J.V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v.63, p.147-173, 2011.
- BALA, A., HALDAR, P.K., KAR, B., NASKAR, S., SAHA, P., KUNDUSEN, S., GUPTA, M., MAZUMDER, U.K. Antioxidant activity of the fractions of *Cleome gynandra* promotes antitumor activity in Ehrlich ascites carcinoma. **Asian Journal of Chemistry**, v.23, n.11, p.5055-5060, 2011.
- BALA, A., KAR, B., HALDAR, P.K., MAZUMDER, U.K., BERA, S. Evaluation of anticancer activity of *Cleome gynandra* on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 1, p. 131-134, 2010.
- BALDI, A., DIXIT, V.K. Enhanced artemisinin production by cell cultures of *Artemisia annua*. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacology**, v.2, p.341-348, 2008.
- BARROSO, G.M., MORIM, M.P., PEIXOTO, A.L., ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes**. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledonôneas. 20.ed. Viçosa: UFV, 1999.
- BASKIN, C.C., BASKIN, J.M. Seeds. **Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 1.ed. San Diego: Academic Press, 2001.
- BETSUI, F., TANAKA-NISHIKAWA, N., SHIMOMURA, K. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. **Plant Biotechnology**, v.21, n.5, p.387-391, 2004.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. Seeds: **Physiology of Development and Germination**. New York: Plenum Press, 1994.
- BLACK, M.J., BEWLEY, J.D., HALMER, P. **The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses**. CABI, 828 p., 2006.
- BONES, A.M., ROSSITER, J.T. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. **Physiology Plantarum**, v.97, p.194-208, 1996.
- BOONSNONGCHEEP, P., KORSANGRUANG, S., SOONTHORNCHAREONNON, N., CHINTAPAKORN, Y., SARALAMP, P., PRATHANTURARUG, S. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.2, p.119-126, 2010.
- BOSE, A., MONDAL, S., GUPTA, J.K., GHOSH, T., DASH, G.K., SI, S. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. **Fitoterapia**, v.78, p.515-520, 2007.
- BOSE, U., BALA, V., GHOSH, T.N., GUNASEKARAN, K., RAHMAN, A.A. Antinociceptive, cytotoxic and antibacterial activities of *Cleome viscosa* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.1, p.165-169, 2011.
- BOURICHE, H., MILES, E.A., SELLOUMA, L., CALDERB, P.C. Effect of *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.72, p.195-201, 2005.
- BOVINI, M.G., FARIA, M., OLIVEIRA, R.R., KURTZ, B.C. Floristic diversity of the Cagarras Islands Natural Monument, Rio de Janeiro, Brazil. **Check List**, v.10, n.2, p.366-373, 2014.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. SDA/MAPA/ACS, 2009.

BROWN, P.D., TOKUHISA, J.G., REICHEL, M., GERSHENZON, J. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v.62, p.471-481, 2003.

BULHÕES, G.C.C., SILVA, A.M., SÁ, M.A.M. **Abordagem fitoquímica de plantas nativas do nordeste brasileiro**. Parte II. Anais do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, v.15, p.39-44, 1976.

BURKE, B.A., CHAN, W.R., HONKAN, V.A. The structure of cleomeolide, an unusual bicyclic diterpene from *Cleome viscosa* L. (*Capparaceae*). **Tetrahedron**, v.36, p.3489-3493, 1980.

CABRAL, S.C.M., AGRA, M.F. Etnomedicina e farmacobotânica das *Capparaceae* da caatinga paraibana, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.79, n.1/2, p.2-6, 1998.

CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPQ, v.1, p.87-132, 1998.

CANHOTO, J.M. **Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Imprensa da Univ. de Coimbra, 407 p., 2010.

CARNAVAL, A.C., HICKERSON, M.J., HADDAD, C.F.B., RODRIGUES, M.T., MORITZ, C.. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v.323, n.5915, p.785-78, 2009.

CASTRO, T.C., SIMÕES, C., ALBARELLO, N., ROMANOS, M.T.V. Atividade antiviral de *Cleome spinosa* produzida *in vivo* e *in vitro* sobre o vírus *Herpes simplex* tipo 2 resistente ao aciclovir. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, SÃO PAULO. JORNAL BRASILEIRO DE FITOMEDICINA, 8., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo, Apsen - Fitomedicina, v.5, p.199, 2007.

CELEDÓN, P.A.F., KOBAYASHI, A.K., VIEIRA, L.G.E. Utilização de nutrientes por células de algodoeiro cultivadas em suspensão. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.431-437, 2000.

CHAICHANA, N., DHEERANUPATTANA, S. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on alkaloid production from *in vitro* culture of *Stemona sp.* **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v.2, n.3, p.146-150, 2012.

CHAICHANA, N., DHEERANUPATTANA, S., JATISATIENR, A., WANGKARN S., PYNE, S. G., MUNGKORNNASAWAKUL, P., SANGTHONG, P., SASTRARUJI, T. Response of stemona alkaloid production in *Stemona sp.* to chitosan and yeast extract elicitors. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v.4, n.4, p.449-454, 2012.

CHATTOPADHYAY, S., FARKYA, S., SRIVASTAVA, A.K., BISARIA, V.S. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.7, p.138-149, 2002.

- CHEN S., PETERSEN, B.L., OLSEN, C.E., SCHULZ, A., HALKIER, B.A. Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.127, p.194-201, 2001.
- CID, L.P.B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa. 303p. 2010.
- CID, L. P. B., TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, Embrapa. p.15-49. 2010.
- COLLINS, D.O., REYNOLDS, W.F., REESE, P.B. New cembranes from *Cleome spinosa*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.179-183, 2004.
- CORDEIRO, L.S., SIMÕES-GURGEL, C., ALBARELLO, N. Multiplication and cryopreservation of adventitious roots of *Cleome rosea* Vahl. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.51, n.3, p.249-257, 2015.
- 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. 153 f., 2000.
- COSTA, A.F. **Farmacognogia**. Volume III. Farmacognosia Experimental. 3ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian:Lisboa, 2000.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. NY, USA: Columbia University Press, 1262 p., 1981.
- CUI, X., CHAKRABARTY, D., LEE, E., PAEK, K. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Bioresource Technology**, v.101, p.4708-4716, 2010.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K.L., FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª edição. Artmed, 2010.
- DAS, P.C., PATRA, A., MANDAL, S., MALLICK, B., DAS, A., CHATTERJEE, A. Cleogynol, a novel dammarane triterpenoid from *Cleome gynandra*. **Journal Natural Product**, v.62, p.616-618, 1999.
- DAXENBICHLER, M.E., SPENCER, G.F., CARLSON, D.G., ROSE, G.B., BRINKER, A.M., POWELL, R.G. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.2623-2638, 1991.
- DHEERANAPATTANA, S., WANGPRAPA, M., JATISATIENR, A. Effect of sodium acetate on stevioside production of *Stevia rebaudiana*. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v.786, p.269-272, 2008.
- DHOLE, J.A., DHOLE, N.A., LONE, K.D., BODKE, S.S. Preliminary phytochemical analysis of weeds in marathwada region. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v.3, n.4, p.764-767, 2012.
- DI STASI, L.C., HIRUMA, C.A., GUIMARÃES, E.M., SANTOS, C.M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v.65, n.6, p. 529-540, 1994.
- DJERIDANE, A., YOUSFI, M., BRUNEL, JEAN, M., STOCKER, P. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of Algerian medicinal plants. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.2599-2606, 2010.

- DÖRNENBURG, H., KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n.8, p.674–684, 1995.
- EDEOGA, H.O., OKWU, D.E., MBAEBI, B.O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.7, p.685-688, 2005.
- EL-ASKARY, H.I. Terpenoids from *Cleome droserifolia* (Forssk.). **Del. Molecules**, v.10, n.8, p.971-977, 2005.
- ELGAMAL, M.H.A., SHALABY, N.M.M., DUDDECK, H. Constituents of *Cleome amblyocarpa*. **Fitoterapia**, v. 58, n.3, 1992.
- EPSTEIN, E., LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. **Physiologia Plantarum**, v.88, n.2, p.382-389, 1993.
- ESHEL, A., BEECKMAN, T. **Plant Roots**. 4 ed. New York: CRC Press, 848 p., 2013.
- EVENARI, M. The physiological action and biological importance of germination inhibitors. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.11, p.21-43, 1957.
- FAHEY, J.W., ZALCMANN, A.T., TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v.56, p.5-51, 2001.
- FALKENBERG, M.B., SANTOS, R.I., SIMÕES, C.M.O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2004.
- FEDERIC, I.E., TOUCHÉ, A., CHOQUART, S., AVANT, I.O., FAY, L., OFFORD, E., COURTOIS, D. High isoflavone content and estrogenic activity of 25 year-old *Glycine max* tissue cultures. **Phytochemistry**, v.64, p.717-724, 2003
- FERMINO JUNIOR, P.C.P., NAGAO, E.O., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Agricola - Piracicaba**, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.
- FETT-NETO, A.G., MELANSON, S.J., SAKATA, K., DICOSMO, F. Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. **Biotechnology**, v.11, p.731-734, 1992.
- FIGUEIREDO, S.F.L., VIANA, V.R.C., SIMÕES, C., ALBARELLO, N., TRUGO, L.C., KAPLAN, M.A.C., KRUL, W.R. Lignans from leaves, seedlings and micropropagated plants of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. - Annonaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p.121-124, 1999.
- FITTER, A. **Characteristics and Functions of Root Systems**. In: WAISEL, Y., ESHEL, A., KAFKAFI, U. (Ed.) *Plant Roots: The Hidden Half*. 3th ed. New York: Marcel Dekker, 2002.
- FLORES, H.E., VIVANCO, J.M., LOYOLA-VARGAS, V.M. 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. **Trends in Plant Science**, v.4, n.6, p. 220-226, 1999.

- FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2004.
- FURR, M. MAHLBERG, P.G. Histochemical analysis of laticifers and gradular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, n.44, p.153-159, 1981.
- FURUYA, T., YOSHIKAWA, T., USHIYAMA, K., ODA, H. Formation of plantlets from callus cultures of ginseng (*Panax ginseng*). **Experientia**, v.42, p.193-194, 1986.
- FUSHIYA, S., KISHI, Y., HATTORI, K., BATKHUU, J., TAKANO, F., SINGAB, A. N.B., OKUYAMA, T. Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages *in vitro*. **Planta Medica**, n.65, p.404-407, 1999.
- GABE, M. **Techniques histologiques**. Masson & Cie, Paris, 1968.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GANGA RAO, B., RAJESWARARAO, P., PRAYAGA MURTY, P., SAMBASIVA RAO, E., MADHUKIRAN, P., MALLIKARJUNA RAO, T., PRANEETH, D. Investigation on regional variation in total phenolic content, alkaloid content and *in vitro* antioxidant activity of *Cleome chelidonii* L. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.4, p.416-418, 2011.
- GAYATHRI DEVI, S., SANGEETHA, S., MARY SHOBA DAS, C. Comparative evaluation of phytochemicals and antioxidant potential of *Cleome viscosa* and *Trichodesma indicum*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.23, n.1, p.253-258, 2013.
- GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE CLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd edition. Vol. 1. The background. Springer, The Netherlands, 2008.
- GOEL, M.K., KUKREJA, A. K., BISHT, N.S. *In vitro* manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v.96,p.1-9, 2009.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998.
- GRZEGORCZYK, I., WYSOKINSKA, H. Liquid shoot culture of *Salvia officinalis* L. for micropropagation and production of antioxidant compounds: effect of triacontanol. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.73, p.99-104, 2008.
- GUERRA, M.P., NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia – LFDGV/CCA/UFSC**. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 41p., 2006.
- GUPTA, A.S., CHAKRAVARTY, M.M. Studies on the seed for composition of desert plants. The component fatty acids of *Gynandropsis pentaphylla* seed fat. **Science and Culture**, v.23, p.306-307, 1957.
- GUPTA, N.K., DIXIT, V.K. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cleome viscosa* Linn. extract. **Indian Journal of Pharmacology**, v.41, n.1, p.36-40, 2009.
- HAKKIM, F.L., KALYANI, S., ESSA, M., GIRIJAB, S., SONG, H. Production of rosmarinic in *Ocimum sanctum* cell cultures by the influence of sucrose,

phenylalanine, yeast extract, and methyl jasmonate. **International Journal of Biological and Medical Research**, v.2, n.4, p.1070 -1074, 2011.

HALKIER, B.A., GERSHENZON, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. **Annual Review Plant Biology**, v.57, p.303-333, 2006.

HANDRO, W., FLOH, E.I.S. A organização de um laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998.

HAQUE, M.S., WADA, T., HATTORI, K. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.50, p.83-89, 1997.

HARRAZ, F.M., ULUBELEN, A., OKSUZ, S., TAN, N. Dammarane triterpenes from *Cleome amblyocarpa*. **Phytochemistry**, v.39, n. 1, p.175-178, 1995.

HASANLOO, T., SEPEHRIFAR, R., RAHNAMA, H., SHAMS, M.R. Evaluation of the yeast-extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in milk thistle hairy root culture. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p.1901-1909, 2009.

HASHEM, F.A., WAHBA, H.E. Isothiocyanates in myrosinase treated herb extract of *Cleome chrysantha* Decne. and their antimicrobial activities. **Phytotherapy Research**, v.14, n.4, p.284-287, 2000.

HAYES, J.D., KELLEHER, M.O., EGGLESTON, I.M. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. **European Journal of Nutrition**, v.47, p.73-88, 2008.

HEBBAR, S.S., HARSHA, V.H., SHRIPATHI, V., HEGDE, G.R. Ethnomedicine of Dharwad district in Karnataka, India—plants used in oral health care. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p.261-266, 2004.

HEZARI, M., KETCHUM, R.E.B., GIBSON, D.M., RODNEY, C. Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.337, n.2, p.185-190, 1997.

HILTON, M.G., RHODES, M.J.C. Factors affecting the growth and hyocyanine production during batch culture of transformed roots of *Datura stramonium*. **Planta Medica**, v.59, p.340-344, 1993.

HOLST, B., WILLIAMSON, G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. **Natural Products Reports**, v.21, p.425-447, 2004.

HOOVER, W.J. *Cleome dendroides*. In: Curtis, S. (Ed.) **Botanical Magazine**. T. 3296. 1834.

HOPKINS, R.J., VAN DAM, N.M., VAN LOON, J.J.A. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 57-83, 2009.

HOPKINS, W.G. **Introduction to Plant Physiology**. 1.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

HUSSAIN, A., QARSHI, I.A., NAZIR, H., ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A., RINALDI, L.M.R. **Recent advances in plant in vitro culture**. 1st edition. In Tech, Croatia, 210p. 2012.

HUSSAIN, J., KHAN, H., ALI, L., KHAN, A.L., REHMAN, N.U., JAHANGIR, S., AL-HARRASI, A. A new indole alkaloid from *Cleome droserifolia*. **Helvetica Chimica Acta**, v.98, p.719-723, 2015.

HUSSEIN, S., LING, A.P.K., NG, T.H., IBRAHIM, R., PAEK, K.Y. Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant, *Eurycoma longifolia*. **Romanian Biotechnological Letters**, v.17, n.1, 2012.

ILTIS, H.H., HALL, J.C., COCHRANE, T.S., SYTSMA, K.J. Studies in the Cleomaceae I. On the separate recognition of Capparaceae, Cleomaceae, and Brassicaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.98, p.28-36, 2011.

ILTIS, H.H., ZAPATA, T.R. Capparaceae. In: BERRY, P.E., HOLTS, B.K. **Flora of the Venezuelan Guyana**. Missouri Botanical Garden Press. Saint Louis. v.4, p.132-156, 1998.

IPAM. **Recuperação de Áreas Degradadas**. (<http://www.ipam.org.br/saiba-mais/Recuperacao-de-areas-Degradadas/5>). 2013. Acesso em 04-04-2013.

ISA. **Monitoramento participativo da Mata Atlântica**. Instituto Sócio Ambiental. Dossiê Mata Atlântica. 409p. 2001.

ISLAM, M.A., ZUBAIR, H., IMTIAZ, N., CHAUDHA, M.F. Effect of different plant growth regulators for the economical production of *in vitro* root cultures of *Cicer arietinum* L. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.7, n.4, p.621-626, 2005.

JAMDHADE-VIJAY, C., BALKHANDE-SHRIVARDHAN, C., SURWASE-BABASAHEB, S. Establishment and analysis of *in vitro* fast-growing normal root culture of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn: a substitute for commercial liquorice. **Research Journal of Biotechnology**, v.7, n.4, p.107-111, 2012.

JANG, Y.P., LEE, Y.J., KIM, Y.C., HUH, H. Production of a hepatoprotective cerebroside from suspension cultures of *Lycium chinense*. **Plant Cellular Report**, v.18, p.252-254, 1998.

JAYANTHI, M., MANDAL, P.K. Plant regeneration through somatic embryogenesis and rapid analysis of regenerated plants in *Tylophora indica* (Burm. F. Merrill.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.37, p.576-580, 2001.

JAZIRI, M., YOSHIMATSU, K., HOMES, J., VANHAELEN, M. Tropane alkaloid production by hairy root cultures of *Datura stramonium* and *Hyocyamus niger*. **Phytochemistry**, v.27, p.419-420, 1988.

JENIFER, U., FRANCINA-CECILIA, K., RAVINDHRAN, R. *In vitro* adventitious root and hairy root cultures in *Boerhaavia diffusa* L. **International Journal of Current Research**, v.4, n.1, p.65-67, 2012.

JENNEWEIN, S., RITHNER, C.D., WILLIAMS, R.M., CROTEAU, R.B. Taxol biosynthesis: Taxane 13-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.13595-13600, 2001.

JENTE, R., JAKUPOVIC, J., OLATUNJI, G.A. A cembranoid diterpene from *Cleome viscosa*. **Phytochemistry**, v.29, n.2, p.666-667, 1990.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940.

- JOSEPH, M.A., MOYSICH, K.B., FREUDENHEIN, J.L., SHIELDS, P.G., BOWMAN, E.D., ZHANG, Y., MARSHALL, J. R., AMBROSONE, C.B. Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. **Nutritional and Cancer**, v.50, p.206-213, 2004.
- KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.3, n.13, p.1222-1239, 2009.
- KHALAFALLA, M.M., DAFFALLA, H.M., EL-SHEMY, H.A., ABDELLATEF, E. Establishment of *in vitro* fast-growing normal root culture of *Vernonia amygdalina* - a potent African medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.21, p.5952-5957, 2009.
- KIM, J.H., CHANG, E.J., OH, H. Saponin production in submerged adventitious root culture of *Panax ginseng* as affected by culture conditions and elicitors. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v.13, n.2, p.87-91, 2005.
- KIM, O.T., KIM, M.Y., HONG, M.H., AHN, J.C., HUANG, B. Stimulation of asiticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. **Plant Cell Reports**, v.23, p.339-344, 2004.
- KIONG, A.L., MAHMOOD, M., FODZILLAN, N.M., DAUD, S.K. Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus culture. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, p.1160-1169, 2005.
- KJAER, A., THOMSEN, H. Isothiocyanates XLII. Glucocleomin, a new natural glucoside, furnishing (-)-5-ethyl-5-methyl-2-oxazolidinethione on enzymic hydrolysis. **Acta Chemica Scandinavica**, v.16, p.591-598, 1962.
- KRAEMER, K.H., SCHENKEL, E.P., VERPOORTE, R. *Ilex paraguariensis* cell suspension culture characterization and response against ethanol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, v. 3, p.257-263, 2002.
- KRAUS, J.E., ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ:EDUR, 1997.
- KRZYZANOWSKA, J., CZUBACKA, A., PECIO, L., PRZYBYS, M., DOROSZEWSKA, T., STOCHMAL, A., OLESZEK, W. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha piperita* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, n.1, p.73-81, 2012.
- KUMAR, S., RAY, A.B., KONNO, C., OSHIMA, Y., HIKINO, H. Cleomiscosin D, a coumarino-lignan from seeds of *Cleome viscosa*. **Phytochemistry**, v.27, n.2, p.636-638, 1998.
- LABOURIAU, L.G. A. **Germinação das sementes**. Washington: Secretaria-Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. 2.ed. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000.
- LEATHERS, R., DAVIN, C., ZRÝD, J. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. (red beet). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.28, p.39-45, 1992.

- LEE-PARSONS, C.W.T., ROGCE, A.J. Precursor limitations in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures. **Plant Cell Reports**, v.25, p.607-612, 2006.
- LEMOS, E.E.P. Organogênese. In: CID, L.P.B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embapa. 303p. 2010.
- LIKENS, S.T., NICKERSON, G.B. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. **Proceedings of the American Brewing Chemists**, v.5, n.5, p.5-13, 1964.
- LIU, C., WANG, Y., GUO, C., OUYANG, F., YE, H., LI, G. Production of artemisinin by shoot cultures of *Artemisia annua* L. in a modified inner-loop mist bioreactor. **Plant Science**, v.135, p.211-217, 1998.
- LOMBARDI, S.P., PASSOS, I.R.S., NOGUEIRA, M.C.S., APPEZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.239-247, 2007.
- LOYOLA-VARGAS, V.M., VÁZQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. Methods in molecular biology. Second Edition. Humana Press. Totowa, New Jersey, 2006.
- MACIEL, J.R., CORNEJO, X., MARQUES, J.S. **Cleomaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB121872>).
- MAHATO, S.B., PAL, B.C., KAWASAKI, T., MIYAHARA, K., TANAKA, O., YAMASAKI, K.J. Structure of cleomeolide, a novel diterpene lactone from *Cleome icosandra*. Linn. **American Chemical Society**, v.101, p.4720-4723, 1979.
- MALAQUIAS, F.S., CARVALHO, T.M., OLIVEIRA, E.F., PELLICCIONE, V.L.B., GIANFALDONI, M.G., FIGUEIREDO, M.R., HENRIQUES, M.G.M.O., ROSAS, E.C., VIANA, V.R.C., ALBARELLO, N., FIGUEIREDO, S.F.L. Atividade antiinflamatória de *Cleome spinosa* e *Hovenia dulcis* cultivadas *in situ* e *in vitro*. In: REUNIÃO ANUAL SOBRE ECOLOGIA SISTEMÁTICA E ECOLOGIA MICROMOLECULARES, 22., 2000, Rio de Janeiro. **Anais...** Faculdade de Farmácia/UFF, P09, 2000.
- MARASCHIN, M., VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.10, p.24-30, 2000.
- MARQUES, J.S. **Cleome in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6813>>. Acesso em: 17 Jun. 2015
- MATHEW, R., SANKAR, P.D. Effect of methyl jasmonate and chitosan on growth characteristics of *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum gratissimum* L. cell suspension cultures. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.21, p.4759-4766, 2012.
- MCNEIL, M.J., PORTER, R.B.R., WILLIAMS, L.A.D., RAINFORD, L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. **Natural Product Communications**, v.5, n. 8, p. 1301-1306, 2010.
- MERCY, S., SANGEETHA, N., GANESH, D. *In vitro* production of adventitious roots containing asiaticoside from leaf tissues of *Centella asiatica* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.48, p.200-207, 2012.

- MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Recuperação de Áreas Degradadas**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/florestas/programa-nacional-de-florestas/item/8705-recupera%C3%A7%C3%A3o-de-%C3%A1reas-degradadas>>. Acesso em 04-04-2013. 2013.
- MONTHANA, R.A.A., MENDEL, R., REISS, C., LINDEQUIST, U. Phytochemical screening and antiviral activity of some medicinal plants from the Island Soqotra. **Phytotherapy Research**, v.20, n.4, p.298-302, 2006.
- MOSKOVKIN, A.S., MIROSHNICHENKO, I.V., UNKOVSKII, B.V., PETROV, K.I. Synthesis and mass spectra of substituted tetrahydro-1,3-oxazine-2-thiones. **Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii Khimiyai Khimicheskaya Tekhnologiy**, v.26, n.1, p.23-26, 1983.
- MULE, S.N., PATIL, S.B., NAIKWADE, N.S., MAGDUM, C.S. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of stems of *Gynandropsis pentaphylla* Linn. **International Journal of Green Pharmacy**, v.2, p.87-90. 2008.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., DA FONSECA, G.A.B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-885, 2000.
- NAGARAJAN, A., ARIVALAGAN, U., RAJAGURU, P. *In vitro* root induction and studies on antibacterial activity of root extract of *Costus igneus* on clinically important human pathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.1, n.4, p.67-76, 2011.
- NAGAYA, H., TOBITA, Y., NAGAE, T., ITOKAWA, H., TAKEYA, K., HALIM, A.F., ABDEL-HALIM, O.B. Cytotoxic triterpenes from *Cleome africana*. **Phytochemistry**, v.44, n.6, p.1115-1119, 1997.
- NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. **Pharmacognosy Reviews**, v.1, p.69-79, 2007.
- NANDAGOPAL, S., KUMARI, B.D.R. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. **Journal of Central European Agriculture**, v.8, n.1, p.73-80, 2007.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: **Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (Ed. by J. Reinart & Y. P. S. Bajaj), p.179-206. Springer Verlag, Berlin, 1977.
- NARENDRHIRAKANNAN, R.T., KANDASWAMY, A., SUBRAMANIAN, S. Anti-inflammatory activity of *Cleome gynandra* L. on hematological and cellular constituents in adjuvant-induced arthritic rats. **Journal of Medicinal Food**, v.8, n.1, p.93-99, 2005.
- NARENDRHIRAKANNAN, R.T., SUBRAMANIAN, S., KANDASWAMY, M. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cleome gynandra* L. leaf extract on acute and chronic inflammatory arthritis studied in rats. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.2, n.1, p.44-53, 2007.
- NARENDRHIRAKANNAN, R.T., SUBRAMANIAN, S., KANDASWAMY, M. Free radical scavenging activity of *Cleome gynandra* L. leaves on adjuvant induced arthritis in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.276, n.1-2, p.71-80, 2005.

- NASCIMENTO, S.C., CHIAPPETA, A.A., LIMA, R.M.O.C. Remove from marked records antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, v.61, n.4, p.353-355, 1990.
- NASEEM, M., JHA, K.K. Differentiation and regeneration in *Cleome* leaves culture *in vitro*. **Egyptian Journal of Botany**, v.1, p.37-49, 1994.
- NASEEM, M., JHA, K.K. Rapid clonal multiplication of *Cleome gynandra* DC. through tissue culture. **Phytomorphology**, v.47, p.405-411, 1997.
- NAVARRO, S.L., LI, F., LAMPE, J.W. Mechanisms of action of isothiocyanates in cancer chemoprevention: an update. **Food and Function**, v.2, p.579-587, 2011.
- NIRAIMATHI, K.L., KARUNANITHI, M., BRINDHA, P. Phytochemical and *in vitro* screening of aerial parts of *Cleome viscosa* Linn. extracts (*Capparidaceae*). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.2, p.27-30, 2012.
- NITSCH, J.P., NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v.163, p.85-87, 1969.
- NOZZOLILLO, C., AMIGUET, V.T., BILY, A.C., HARRIS, C.S., SALEEM, A., ANDERSEN, O.M., JORDHEIM M. Novel aspects of the flowers and floral pigmentation of two *Cleome* species (*Cleomaceae*), *C. hassleriana* and *C. serrulata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, n.38, p.361-369, 2010.
- NWAOGU, L.A., UDEBUANI, A.C. Effect of processing on the nutritional and toxicological components of *Cleome rutidosperma* seed. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.183-186, 2010.
- OJIAKO, O.A., IGWE, C.U. Nutritional and anti-nutritional compositions of *Cleome rutidosperma*, *Lagenaria siceraria* and *Cucurbita maxima* seeds from Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, v.10, p.735-738, 2007.
- OKORO, I.O., UMAR, I.A., ATAWODI, S.E., ANIGO, K.M. Bioassay-guided evaluation of the antidiabetic activity of *Cleome rutidosperma* DC. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.1, p.198-202, 2015.
- OLIVEIRA, D.M.T. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.1, p.85-97, 2001.
- PARIMALADEVI, B., BOOMINATHAN, R., MANDAL, S.C. Evaluation of antipyretic potential of *Cleome viscosa* Linn. (*Capparidaceae*) extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p.11-13, 2003b.
- PARIMALADEVI, B., BOOMINATHAN, R., MANDAL, S.C. Studies on analgesic of *Cleome viscosa* in mice. **Fitoterapia**, v.74, p.262-266, 2003a.
- PARIMALAKRISHNAN, S., DEY, A., MANAVALAN R. Effect of the methanolic extract of *Cleome chelidonii* on drug metabolizing enzymes, antioxidant status and chemomodulatory efficacy in mice. **Journal of Basic and Applied Sciences**, v.5, n.1, p.37-46, 2009.
- PASKA, C., INNOCENT, G., KUNVARI, M., LASZLO, M., SZILAGYI, L. Lignan production by *Ipomea cairica* callus culture. **Phytochemistry**, v.52, p.879- 883, 1999.

- PERUJMAL SAMY, R., IGNACIMUTHU S., RAJA, D.P. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p. 235-240, 1999.
- PHATAK, S.V., HEBLE, M.R. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. **Fitoterapia**, v.73, p.32-39, 2002.
- PILLAI, L.S., NAIR, B.R. A comparative study of the anthelmintic potential of *Cleome viscosa* L. and *Cleome burmanni* W. and A. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, n.1, p.98-100, 2011.
- QIN, G., HAMED, A.I., EL-EMARY, N.A., CHEN, Y., WANG, L., CHEUNG, K., CHENG, K. A new trinortriterpenoid from *Cleome chrysantha*. **Planta Medica**, v.66, p.191-193, 2000.
- QIN, Y., ZENG, F., SUN, X., FENG, Y., YANG, C. Propagation of *Cleome spinosa* Jacq. through Tissue Culture. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v.1, n.5, p.1319-1327, 2012.
- QU, J.G., YU, X.J., ZHANG, W., JIN, M.F. Significant improved anthocyanins biosynthesis in suspension cultures of *Vitis vinifera* by process intensification. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bae**, v.22, p.299- 305, 2006.
- QUIALA, E., BARBON, R., JIMENEZ, E., FERIA, M.D., CHAVEZ, M., CAPOTE, A., PEREZ, N. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. A medicinal plant in temporary immersion systems. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.42, p.298-300, 2006.
- RAMACHANDRA RAO, S., RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, p.101-153, 2002.
- RAMANI, S., JAYABASKARAN, C. Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. **Journal of Molecular Signaling**, v.25, p.3-9, 2008.
- RAO, K.V., VENKANNA. N, LAKSHMI, N.M. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Artemisia annua*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.57, p.773-776, 1998.
- RAY, A.B., CHATTOPADHYAY, S.K. Structure of cleomiscosin A, a coumarino-lignoid of *Cleome viscosa* seeds. **Tetrahedron Letters**, v.21, p.4477-4480, 1980.
- RAY, A.B., CHATTOPADHYAY, S.K., KUMAR, S. Structures of cleomiscosins, coumarino-lignoids of *Cleome viscosa* seeds. **Tetrahedron Letters**, v.41, n.1, p.209-214, 1985.
- REBOUÇAS, F.S., ALMEIDA, W.A.B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmento foliar. **Cultivo in vitro de Plantas Mediciniais**, p.35, 2009.
- REMOTTI, P.C., LÖFFLER, H.J.M. Callus induction and plant regeneration from gladiolos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.171-178. 1995.
- ROCHA, A.S., ROCHA, E.K., ALVES, L.M., MORAES, B.A., CASTRO, T.C., ALBARELLO, N., SIMÕES-GURGEL, C. Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the *in vitro* cultures of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.24, n.1, p.105-113, 2013.

ROSTAMPOUR, S., SOHI, H. H., DEHESTANI, A. *In vitro* regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). **Biologia**, v.65, p.647–652, 2010.

SADO, M. **Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva.** Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente - Instituto de Botânica, 2009.

SALMA, U., RAHMAN, M.S.M., ISLAM, S., HAQUE, N., JUBAIR, T.A., HAQUE, A.K.M.F., MUKTI, I.J. The influence of different hormone concentration and combination on callus induction and regeneration of *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. **Pakistan Journal of Biological Science**, v.11, p.1638-1641, 2008.

SANCHEZ-ACEBO, L. A phylogenetic study of the new world *Cleome* (Brassicaceae, Cleomoideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.92, p.179–201, 2005.

SARADHA, J.K, RAO, B.S. *In vitro* antibacterial activity of *Cleome viscosa* linn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.1, n.2, p.71-78, 2010.

SASS, J.E. **Botanical Microtechnique**. 2.ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951.

SATHYANARAYANA, B.N., VARGHESE, D.B. **Plant Tissue Culture**. Practices and new experimental protocols. I. K. International Pvt Ltd., 316p., 2007.

SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 5 ed., 2004.

SCHRIPSEMA, J., RAMOS-VALDIVIA, A., VERPOORTE R. Robustaquinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension culture. **Phytochemistry**, v.51, p.55-60, 1999.

SHABANI, L., EHSANPOUR, A. A., ASGHARI, G., EMAMI, J. Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.56, n.5, p.621-626, 2009.

SHARAF, M., EL-ANSARI, M.A., SALEH, N.A.M. Flavonoids of four *Cleome* and three *Capparis* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.25, n.2, p.161-166, 1997.

SHARAF, M., MANSOUR, R.M.A., SALEH, N.A.M. Exudate flavonoids from aerial parts of four *Cleome* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.20, n.5, p.443-448, 1992.

SHARMA, S., CHATTOPADHYAY, S.K., TRIVEDI, P., BAWANKULE, D.U.. Synthesis and anti-inflammatory activity of derivatives of coumarino-lignoid, cleomiscosin A and its methyl ether. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.5150-5156, 2010.

SHARMA, S., CHATTOPADHYAY, S.K., YADAV, D.K., KHAN, F., MOHANTY, S., MAURYA, A., BAWANKULE, D.U. QSAR, docking and *in vitro* studies for anti-inflammatory activity of cleomiscosin A methyl ether derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, p.952-964, p.2012.

SHEKHAWAT, M.S. Root cultures and *in vitro* production of alkannin in *Arnebia hispidissima* (lehm). dc. **International Journal of Recent Scientific Research**, v.3, n.5, p.374-377, 2012.

SIMÕES, C. **Estabelecimento de um sistema de propagação *in vitro* e avaliação do potencial medicinal de *Cleome rosea* VAHL (Capparaceae)**. 2002. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia, UERJ, Rio de Janeiro.

SIMÕES, C., ALBARELLO, N., CALLADO, C.H., CASTRO, T.C., MANSUR, E. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.98, p.79-86, 2009a.

SIMÕES, C., ALBARELLO, N., CASTRO, T.C., MANSUR, E. Production of anthocyanins by plant cell and tissue culture strategies. In: ORHAN, I. **Biotechnological production of plant secondary metabolites**. Chapter 5. Bentham Science Publishers. 262p. 2012.

SIMÕES, C., BIZARRI, C.H.B., CORDEIRO, L.S., CASTRO, T.C., COUTADA, L.C.M., SILVA A.J.R., ALBARELLO N., MANSUR E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p.895-903, 2009b.

SIMÕES, C., CASTRO, T.C., CORDEIRO, L.S., ALBARELLO, N., MANSUR, E., ROMANOS, M.T.V. Antiviral activity of *Cleome rosea* extracts from field-grown plants and tissue culture-derived materials against acyclovir-resistant *Herpes simplex* viruses type 1 (ACVr-HSV-1) and type 2 (ACVr-HSV-2). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 93-99, 2010.

SIMÕES, C., MATTOS, J.C.P., SABINO, K.C.C., CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A., COELHO, M.G.P., ALBARELLO, N., FIGUEIREDO, S.F.L. Medicinal potencial from *in vivo* and acclimatized plants of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparaceae). **Fitoterapia**, v. 77, p. 94-99, 2006.

SIMÕES, C., SANTOS, A.S., ALBARELLO, N., FIGUEIREDO, S.F.L. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from stem explants of *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae). **Journal Plant Biotechnology**, v.6, p.199-204, 2004.

SIMÕES-GURGEL, C., CORDEIRO, L. S., CASTRO, T. C., CALLADO, C. H., ALBARELLO, N., MANSUR, E. Establishment of anthocyanin-producing cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparaceae). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.106, n.3, p.537-545, 2011.

SIMÕES-GURGEL, C., ROCHA, A.S., CORDEIRO, L.S., GAYER, C.R.M., CASTRO, T.C., COELHO, M.G.P., ALBARELLO, N., MANSUR, E., ROSA, A.C.P. Antibacterial activity of field-grown plants, *in vitro* propagated plants, callus and cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Journal of Pharmacy Research**, v.5, n.6, p.3304-3308, 2012.

SIVAKUMAR, G. Bioreactor technology: A novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. **Biotechnology Journal**, v.1, p.1419-1427, 2006.

- SIVANESAN, I., JEONG, B.R. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.20, p. 5294-5300, 2009.
- SKRZYPCZAK-PIETRASZEK, E., SŁOTA, J., PIETRASZEK, J. The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. **Acta Biochimica Polonica**, v.61, n.1, p.47-53, 2014.
- SMALLEGANGE, R.C., VAN LOON, J.J.A., BLATT, S.E., HARVEY, J.A., AGERBIRK, N., DICKE, M. Flower vs leaf feeding by *Pieris brassicae*: Glucosinolate-rich flower tissues are preferred and sustain higher growth rate. **Journal of Chemical Ecology**, v.33, p.1831-1844, 2007.
- SMETANSKA I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.111, p.187-228, 2008.
- SONGSAK, T., LOCKWOOD, G.B. Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand. **Fitoterapia**, v.73, p.209-216, 2002.
- SONGSAK, T., LOCKWOOD, G.B. Production of two volatile glucosinolate hydrolysis compounds in *Nasturtium montanum* and *Cleome chelidonii* plant cell cultures. **Fitoterapia**, v.75, p.296-301, 2004.
- SOUZA, J.S.I., PEIXOTO, A.M., TOLEDO, F.F. **Enciclopédia agrícola brasileira:C-D**. Volume 2. Editora EdUSP. 608p. 1995.
- SOUZA, J.S.I., PEIXOTO, A.M., TOLEDO, F.F. **Enciclopédia Agrícola Brasileira: E-H**. Vol. 3, São Paulo: EdUSP, 511 p., 2000.
- SPITZ, M.R., DUPHORNE, C.M. DETRY, M.A., PILLOW, P.C., AMOS, C.I., LEI, L., DE ANDRADE, M., GU, X., HONG, W.K., WU, K. Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione-S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Preview**, v.9, p.1017-1020, 2000.
- SRIVASTAVA, S., SRIVASTAVA, A. K. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.27, p.29-43, 2007.
- SRIVASTAVA, S.K. Stigmasta-5,24(28)-diene-3 β -O- α -L-rhamnoside from *Cleome viscosa*. **Phytochemistry**, v.19, p.2510-2511, 1980.
- SUDHA, C.G., SEENI, S. Establishment and analysis of fast-growing normal root culture of *Decalepis arayalpathra*, a rare endemic medicinal plant. **Current Science**, v.81, p.371-374, 2001.
- SUDHAKAR, M., RAO. CH.V., RAO, P.M., RAJU, D.B. Evaluation of antimicrobial activity of *Cleome viscosa* and *Gmelina asiatica*. **Fitoterapia**, v.77, p.47-49, 2006.
- SULTANA, T., PORTER, N. G., SAVAGE, G. P., MCNEIL, D. L. Comparison of isothiocyanate yield from wasabi rhizome tissues grown in soil or water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3586-3591, 2003.
- SVENDSEN, A.B., VERPOORTE, R. **Chromatography of Alkaloids**. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1983.
- TAN, S.H., MUSA, R., ARIFF, A., MAZIAH, M. Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga

(*Centella asiatica* L. urban). **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.6, n.4, p.284-299, 2010.

TAYA, M., MINE, K., KINOKA, M., TONE, S., ICHI, T. Production and release of pigments by cultures of transformed hairy roots of red beet. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.73, p.31-36, 1992.

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. **Biociência e Desenvolvimento**, n.24, janeiro/fevereiro, 2002.

TEIXEIRA, J.B., CID, L.P.B. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. In: CID, L.P.B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embapa. 303p. 2010.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.

TESHIMA, D., IKEDA, K., SATAKE, M., AOYAMA, T., SHIMOMURA, K. Production of emetic alkaloids by *in vitro* culture of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. **Plant Cell Reports**, v.7, p.278-280, 1988.

THORPE, T.A. History of Plant Cell Culture. In: SMITH, R.H. **Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments**. Academic Press, Third Edition. 188p. 2012.

TIGRINE, C., BULZOMI, P., LEONE, S., BOURICHE, H., KAMELI, A., MARINO, M. *Cleome arabica* leaf extract has anticancer properties in human cancer cells. *Pharmaceutical Biology*, **Early Online**, p.1-7, 2013.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1.ed. Brasília: SPI. 1998.

TSAI, Y.T., CHEN, P.Y., TO, K.Y. Plant regeneration and stable transformation in the floricultural plant *Cleome spinosa*, a C3 plant closely related to the C4 plant *C. gynandra*. **Plant Cell Reports**, v.31, p.1189-1198, 2012.

TSICHRITZIS, F., ABDEL-MOGIB, M., JAKUPOVIC, J. Dammarane triterpenes from *Cleome africana*. **Phytochemistry**, v.33, n.2, p.423-425, 1993.

UMAMAHESWAI, A., LALITHA, V. *In vitro* effect of various growth hormones in *Capsicum annum* L. on the callus induction and production of Capsiacin. **Journal of Plant Sciences**, v.2, p.545-551, 2007.

UPADHYAY, R.K., AHMAD, S., JAISWAL, G., DWIVEDI, P. ANDTRIPATHI, R. Antimicrobial effects of *Cleome viscosa* and *Trigonella foenum graecum* seed extracts. **Journal of Cell and Tissue Research**, v.8, n.2, p.1355-1360, 2008.

VAARIO, L., OTOMO, Y., SODA, R., IDE, Y. Plant regeneration from root tissue and establishment of root culture of Japanese White Birch (*Betula platyphylla* var. japonica). **Plant Tissue Culture Letters**, v.12, n.3, p.251-258, 1995.

VAN DAM, N.M., TYTGAT, T.O.G., KIRKEGAARD, J. Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. **Phytochemistry Reviews**, v.8, p.171-186, 2009.

VANISREE, M., LEE, C., LO, S., NALAWADE, S.M., LIN, C.Y., TSAY, H. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.1-22, 2004.

VERPOORTE, R., ALFERMANN, A.W. **Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism**. Netherlands:Kluwer Academic Publishers, 2000.

WAWROSCH, C., SCHWAIGER, S., STUPPNER, H., KOPP, B. Lignan formation in hairy root cultures of Edelweiss (*Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter). **Fitoterapia**, v.97, p.219–223, 2014.

WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, v.9, p.585–600, 1934.

WILLIAMS, L.A.D., VASQUES, E., REID, W., PORTER, R., KRAUS, W. Biological activities of an extract from *Cleome viscosa* L. (Capparaceae). **Naturwissenschaften**, v.90,p.468–472, 2003.

YANIV, Z., BACHRACH, U. Roots as a Source of Metabolites with Medicinal Activity. In: WAISEL, Y., ESHEL, A., KAFKAFI, U. (Ed.) **Plant Roots: The Hidden Half**. 3th ed. New York: Marcel Dekker, 2002.

YOSHIKAWA, T., FURUYA, T. Morphinan alkaloid production by tissues differentiated from cultured cells of *Papaver somniferum*. **Planta Medica**, p.110-113, 1985.

ZHANG, Y. The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. **Carcinogenesis**, v.33, n.1, p.2-9, 2012.

ZHANG, Z., YU, Z., JIN, Z., LIU, J., LI, Y. Liquid culture of adventitious roots is a potential alternative to field cultivation for *Psammosilene tunicoides*, a rare and endangered endemic medicinal plant. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.5, n.2, p.127-131, 2013.

ZHAO, J., ZOU, L., ZHANG, C., LI, Y., PENG, L., XIANG, D., ZHAO, G. Efficient production of flavonoids in *Fagopyrum tataricum* hairy root cultures with yeast polysaccharide elicitation and medium renewal process. **Pharmacogn Magazine**, v.10, n.39, p.234–240, 2014.

ZOBAYED, S.M.A., SAXENA, P.K. *In vitro*-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. **Plant Science**, v.165, p.463-470, 2003.

ANEXO - Reagente de Groots

(ASPEREN, K.V. The determination of 4-methyl-2-thiouracil in animal blood, urine and faeces. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.6, p.187-191, 1950).

VOL. 6 (1950)

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA

187

**THE DETERMINATION OF 4-METHYL-2-THIOURACIL IN
ANIMAL BLOOD, URINE AND FAECES**

by

K. VAN ASPEREN

Laboratory for Veterinary Physiology, University, Utrecht (Netherlands)

INTRODUCTION

Searching for methods for the determination of methylthiouracil in hen's blood, of which in most cases only small quantities are available, we had to simplify the methods described by VAN GENDEREN, VAN LIER AND DE BEUS¹. These methods often take up much time, which may be a serious disadvantage for many experiments. The method finally adopted proved to be sufficiently accurate for our purpose. In the determinations in plasma the precipitation of proteins was omitted; for total blood the precipitation procedure indicated by CHESLEY² gave reliable results. Linkage of methylthiouracil with plasma proteins, which would interfere with these methods of determination, does not occur in our *in vitro* experiments and we do not believe it to be of great importance in the body.

The determination of methylthiouracil in human urine is very simple. Colorimetric determination of the green reaction product obtained by mixing a known amount of optically clear urine with GROTE's reagent, after adjustment of pH to about 8.0, gives good results. As small differences in procedure may have great influence we propose to give a detailed description of the method in this paper.

Greater difficulties are encountered in determining methylthiouracil in hen's urine, as in these animals urine and faeces are mixed before leaving the body. We therefore determined methylthiouracil in the mixture of urine and faeces and tried to differentiate between urine and faeces in another way. As a number of disturbing factors proved to be present in this mixture a simple extraction-procedure did not suffice, but we obtained very good results by dialysing the mixture of faeces and urine at slightly acid reaction. We shall describe this method below.

All determinations were carried out with GROTE's reagent, prepared according to the prescription of MØRCH³. By adding of boric acid-borax buffer the pH of the reaction mixture was adjusted to 7.5-8.5 and the absorption of light by the green-coloured solution was measured with the aid of a photoelectric colorimeter with a dark-red filter.

EXPERIMENTAL

I. Grote's reagent

The preparation of the reagent was based on the prescription given by MØRCH. As, however, details may be of great importance, we shall describe the method, as used by us. 1 gram of sodium nitroprusside and 1 g of hydroxylamine hydrochloride were dissolved in 20 ml of distilled water and

References p. 191.

2 g of sodium bicarbonate were added in small portions. The solution was shaken until the fizzing stopped. Thereupon 0.1 ml of bromine was added and the solution was again shaken for about 5 minutes. Then the solution was filtered into a volumetric flask and diluted with distilled water to 50 ml. The reagent was distinctly brown at first, but after a short time a yellow precipitate appeared on the bottom of the flask. Sometimes this precipitate was removed by filtration, but this proved to be unnecessary if care was taken not to include any precipitate in the solution used for the colorimetric reaction. The differences between one batch of reagent and another one proved to be only small. If the reagent was kept in refrigerator it could be used for several weeks, but during that time the light extinction of the colour, developed with a standard solution of methylthiouracil, decreased gradually. For these reasons we thought it necessary to run an experiment with a standard solution at least once every two days.

2. The determination in plasma or serum without precipitation of proteins

The determination of methylthiouracil in the serum of horses and cattle may be carried out as follows: to 0.5 ml of serum are added 5.1 ml of borax buffer and 0.4 ml of GROTE's reagent. About 15 minutes after adding the reagent the light absorption by the green-coloured reaction mixture is measured and compared to the absorption of a standard solution of methylthiouracil in distilled water. It is necessary to subtract the extinction value, obtained with a sample of serum containing no methylthiouracil (serum blank). This value, however, is fairly small and constant. As the reaction velocity decreases with increasing age of the reagent, it may be recommended to determine the extinction at different times, choosing the maximal extinction value for calculation.

A few examples of determinations are given in Table I.

TABLE I
RECOVERY OF ADDED METHYLTHIOURACIL

E is the extinction coefficient* = $\frac{1}{2} \log 100/I$, in which I is the intensity of the light transmitted by the sample in percentage of the original intensity.
mtu-serum = serum containing 10 mg pCt methylthiouracil.

	mtu-serum	serum blank	E-blank	standard 10 mg pCt	reagent blank	E-blank	Recovery
Horse	0.121	0.020	0.101	0.118	0.010	0.108	94 pCt
Horse	0.116	0.014	0.102	0.117	0.005	0.112	91 pCt
Horse	0.128	0.013	0.115	0.127	0.005	0.122	94 pCt
Cow	0.120	0.016	0.104	0.118	0.003	0.115	90 pCt

* The extinction = $\log 100/I$ is divided by 2, as a cell of 2 cm width is used.

Several experiments showed that the extinction-concentration diagram is in accordance with the law of BEER-LAMBERT for concentrations ranging from 1 to 40 mg pCt. So the conclusion seems justified that recovery in this range of concentrations is about 90-95 pCt. At low concentrations, however, the uncertainty pertaining to the serum blank values may form a serious difficulty when determining methylthiouracil in plasma or serum.

The determination of methylthiouracil in hen's plasma meets with some technical difficulties:

a. The amount of plasma available is rather small, especially when several determinations have to be performed on the same animal at short intervals. In many cases we only had 1 ml of plasma at our disposal.

References p. 191.

Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and *in vivo* and *in vitro* germination of species of the genus *Cleome*¹

Tatiana Carvalho de Castro^{2*}, Claudia Simões-Gurgel², Ivan Gonçalves Ribeiro²,
Marsen Garcia Pinto Coelho³, Norma Albarello²

ABSTRACT - The genus *Cleome* is widely distributed in drier areas of the tropics and subtropics. *Cleome dendroides* and *C. rosea* are Brazilian native species that occur mainly in Atlantic Forest and sandy coastal plains, respectively ecosystems negatively affected by human impacts. *Cleome spinosa* is frequently found in urban areas. Many *Cleome* species have been used in traditional medicine, as *C. spinosa*. In the present work, was investigated *C. dendroides*, *C. rosea* and *C. spinosa* germinative behavior under *in vivo* conditions, as well as was established suitable conditions to *in vitro* germination and seedling development. The *in vivo* germination was performed evaluating the influence of temperature, substrate and light. It was observed that only *C. spinosa* seeds presents physiological dormancy, which was overcome by using alternate temperatures. The substrate influenced significantly the germination of *C. rosea* and the seeds of *C. dendroides* showed the highest germination percentages in the different conditions evaluated. The post-germination development stages under *in vivo* and *in vitro* conditions were defined. It was observed that the development was faster under *in vitro* than *in vivo* conditions. An effective methodology for *in vitro* germination, enabling the providing of material to experiment on plant tissue culture was established to *C. dendroides* and *C. spinosa*.

Index terms: *Cleome dendroides*, *Cleome rosea*, *Cleome spinosa*, post-germination development.

Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e germinação *in vivo* e *in vitro* de espécies do gênero *Cleome*

RESUMO - O gênero *Cleome* encontra-se distribuído em áreas tropicais e subtropicais do mundo. *Cleome dendroides* é uma espécie endêmica de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro, enquanto *C. rosea* é uma espécie nativa que ocorre principalmente em restingas, ambos ecossistemas que sofrem constante impacto antrópico. *Cleome spinosa* é frequentemente encontrada em áreas urbanas. Muitas espécies de *Cleome* têm sido utilizadas na medicina tradicional, como *C. spinosa*. No presente trabalho, avaliou-se a influência do substrato, da temperatura e da luz sobre a germinação *in vivo* das três espécies, bem como determinaram-se as condições para germinação *in vitro* e as etapas do desenvolvimento pós-germinativo. Observaram-se que apenas sementes de *C. spinosa* apresentam dormância fisiológica, a qual é superada utilizando-se temperaturas alternadas. O substrato influenciou significativamente a germinação de *C. rosea* e as sementes de *C. dendroides* apresentaram alta porcentagem de germinação nas diferentes condições avaliadas. As etapas do desenvolvimento pós-germinativo sob condições *in vivo* e *in vitro* foram definidas. Observou-se que o desenvolvimento sob condições *in vitro* foi mais acelerado que *in vivo*. Uma eficiente metodologia para germinação *in vitro* foi estabelecida para *C. dendroides* e *C. spinosa*, fornecendo material juvenil em condições assépticas para futuros experimentos de cultura de tecidos vegetais.

Termos para indexação: *Cleome dendroides*, *Cleome rosea*, *Cleome spinosa*, desenvolvimento pós-germinativo.

Introduction

Cleome is the largest genus from Cleomaceae family, with over 200 species distributed in drier areas of the tropics and subtropics (Iltis, 1960). It consists mainly of annual or

perennial herbaceous plants and, rarely, shrubs. Several species of *Cleome* are used in traditional medicine and many of them have been subject of pharmacological and phytochemical studies (Aparadh et al., 2012). In Brazil, some of these species have been used in traditional medicine, such

¹Submitted on 08/14/2014. Accepted for publication on 09/01/2014.

²Departamento de Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, 20550-013 - Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, 20550-170 - Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Corresponding author - tatianaccastro17@gmail.com

as *C. spinosa*, used in the treatment of diseases related to respiratory tract, and several inflammatory disorders (Agra et al., 2007). Several species may be employed as ornamental due to their attractive inflorescences.

Biotechnological studies have been conducted with *Cleome* species in order to develop efficient protocols for mass propagation and to enhance the production of bioactive molecules under *in vitro* conditions. Such studies have been performed with *C. rosea* Vahl, Brazilian native species mainly found in coastal sandy plains, ecosystems negatively affected by human impacts and *C. spinosa* Jacq., found in urban areas and highly vulnerable to human activities and insect infestations. *In vitro* protocols were established for these species (Simões et al., 2004; Albarello et al., 2006; Albarello et al., 2007; Simões et al., 2009a; Simões et al., 2010a; Simões-Gurgel et al., 2012), and the medicinal potential of *in vivo* and *in vitro* materials was also evaluated (Simões et al., 2006; Simões et al., 2009b; Simões et al., 2010b; Simões-Gurgel et al., 2012; Albarello et al., 2013).

Germination is a critical stage in plants the life cycle and tends to be highly unpredictable over space and time (Baskin and Baskin, 2001). Successful establishment of plants largely depends on successful germination. The germination process may be affected by environmental and internal seed factors and frequently, ideal conditions are species-specific and need to be determined through experimentation.

There is little information available in literature about seed germination of *Cleome*. These studies report low and non-uniform germination, presence of seed dormancy and a significantly variation in germination rates depending on the seed lot used (Ochudho and Modi, 2007; Raboteaux and Anderson, 2010; Tlig et al., 2012; K'Opondo, 2011). As seeds, in general, are more resistant to disinfection treatments required to obtain aseptic material, when compared to tissues of a developed plant, physiological knowledge of *in vitro* germination allows the establishment of efficient methods that ensure the supply of stock plants in excellent phytosanitary conditions to be used as source of explants for plant tissue culture. There are no studies related to *in vitro* germination of the three species selected.

The purpose of this research was to investigate *C. dendroides*, *C. rosea* and *C. spinosa* germinative behavior under *in vivo* conditions, as well as to establish suitable conditions to *in vitro* germination and seedling development.

Materials and Methods

Seeds of the three species selected were collected in Rio de Janeiro state, Brazil. Fruits were collected from populations

located at 22°56'60" S and 43°10'0" W (*C. dendroides*), at 22°58'01" S and 42°58'36" W (*C. rosea*), and at 22°54'17" S and 43°15'52" W (*C. spinosa*). The authenticity of the specimens was previously confirmed and vouchers specimen were deposited in the Herbarium of the Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil (*C. dendroides* / HRJ11.104, *C. rosea* / HRJ7185, *C. spinosa* / HRJ7639).

The variables evaluated for fruits were fruit length, thickness, shape and color, whereas for seeds, were seed length, thickness, shape, color, fresh and dry weight, moisture content, viability, coat permeability and mean number of seeds per fruit.

Analysis followed the Rules for Seed Testing (Brasil, 2009). Ten seed lots with one (*C. spinosa* and *C. rosea*) or five (*C. dendroides*) seeds each were weighed to determine the fresh weight (FW) and then subjected to drying in an oven at 105±3 °C for 24 h to determine the dry weight (DW). The moisture content (MC) was defined as: $MC = (FW - DW) / FW \times 100$.

Seed viability was determined through the triphenyl tetrazolium chloride (TTC) test using five lots of 20 seeds. Seeds were longitudinally sectioned and soaked in 2% TTC solution at 30 °C for 24h in the dark. The viability was assessed using a stereomicroscope (Olympus SD30).

To evaluate seed-coat permeability, eleven lots of five seeds were immersed in distilled water for 24 h at 26 ± 1 °C. During successive periods the fresh weight of each lot was measured to establish the imbibition curve.

Seeds were washed with detergent Fisoex® (10%), rinsed in tap water, and placed in sodium hypochlorite (NaOCl) at different concentrations (1.0; 2.0 or 2.5% w/v) containing Tween 80 (0.05% w/v) for different periods (5; 10 or 20 min). Seeds were rinsed thrice with sterile distilled water and were germinated in transparent plastic germination boxes (Gerbox) (11 x 11 x 3.5 cm). Different substrates were tested: vermiculite (average grain diameter 1.4 to 4.0 mm), sand and towel paper. Substrates were autoclaved at 121 °C for 45 min and moistened with sterile distilled water. The effect of constant (20 and 25 °C) and alternate (15-25 and 20-30 °C) temperatures was evaluated. The experiments were conducted in germination chamber (Eletrolab EL202), under a 16 h photoperiod (20 mmol m⁻²s⁻¹) and relative humidity of 80%. Another set of experiments was conducted in the absence of light using the best conditions of temperature and substrate established for each species in the previous experiment.

Based on the method proposed by Labouriau (1983), germination rate (GR), mean germination time (GT), coefficient of velocity of germination (GV) and relative frequency of germination (GF) were measured and defined as:

$$\text{Germination rate: GR} = N/A \times 100$$

where: N = total number of germinated seeds; A = total number of seeds;

Mean germination time: $GT = \Sigma n_i t_i / \Sigma n_i$

where: n_i = total number of germinated seeds per day; t_i = incubation time (days); Σn_i = total number of germinated seeds.

Coefficient of velocity of germination: $GV = GT^{-1}$

Relative frequency of germination related to the incubation time: $GF (\%) = n_i \cdot 100 / \Sigma n_i$

Evaluations were performed every two days during 50 days. When needed substrates were moistened to keep suitable conditions for germination and seedling development. Twelve treatments (three substrates x four temperatures) were considered with three replications of 20 seeds. Experiments were repeated twice.

Seeds were washed with detergent Fisoex® (10%), rinsed in tap water, and disinfected under aseptic conditions in laminar flow hood. Two protocols of decontamination were evaluated: exposure to atmosphere saturated with formaldehyde (paraformaldehyde 80%) for 1, 2 and 3 h, and immersion in a solution of NaOCl (1.0; 1.5; 2.0 and 2.5% w/v) containing Tween 80 (0.05% w/v) for 10, 15, 20 and 30 min. After that, the seeds were rinsed thrice with sterile distilled water and inoculated into flasks containing 30 mL of MS medium (Murashige and Skoog, 1962) added with 30 g L⁻¹ sucrose and solidified with 8 g L⁻¹ agar. The pH of media was adjusted to 5.8 prior to autoclaving (121 °C - 15 min).

Flasks were closed with polypropylene caps and maintained in a growth chamber at 26 ± 2 °C, under a 16 h photoperiod provided by cool white fluorescent tubes (45 mmol m⁻²s⁻¹) or in germination chambers (Eletrolab EL202) under alternate temperatures (20-30 °C), a 16 h photoperiod (20 mmol m⁻²s⁻¹) and relative humidity of 80%. Four seeds were inoculated in each flask in a total of 30 flasks per treatment. Experiments were repeated twice.

The germination was carried out on MS medium with reduced salt concentrations (MS1/2, MS1/3 and MS1/4). Seeds of *C. rosea* were also inoculated on MS medium containing glucose (30 g L⁻¹) as source of carbohydrate and phytigel (2 g L⁻¹) as solidified agent. The influence of aeration was evaluated using aerated caps (Sigma B-3031) to close the flasks.

Morphological aspects were recorded since root protrusion to primary leaves expansion (Brasil, 2009). Root, hypocotyl and epicotyl length as well as the number of leaves, were measured. Seedlings were considered normal when essential structures were perfectly developed (root system well developed, hypocotyl, two cotyledons, epicotyl with apical bud and primary leaves expanded), according to Rules for Seed Testing (Brasil, 2009). The external morphology of seeds, fruits and seedlings were described and illustrated.

Graphic records were obtained from fresh material using a stereomicroscope (Olympus SD30) and photographs were taken using Sony H9 camera.

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA). Data from germination percentage, when necessary, were transformed into arcsine prior to analysis to normalize their distribution. Means were compared by Tukey test at 5% probability ($p \leq 0.05$). The analyses were performed using the GraphPad Prism version 5.0 software.

Results and Discussion

Although the three species under study presented morphological similarities, some traits showed to be species-specific (Table 1). Fruits are siliqua-shaped capsules, dry and dehiscent, and in *C. dendroides* they are also inflated. In *C. rosea* the capsules are greenish (Figure 1A), while in *C. dendroides* (Figure 1B), they are greenish and turn pale brown when riped and in *C. spinosa* capsules are pale yellow turning brown when riped (Figure 1C). The fruit dehiscence occurs from base to apex separating the two valves, to release the seeds. Some seeds may remain attached to the *replum*, a strip holding the valves edges (Figure 1D).

Seeds of three species are small and present particular morphological traits in each species. In *C. spinosa* the seeds are pale yellow to dark brown with kidney-like to cochlear shape with exarillate seed coat, having open terminations and crests on the surface (Figure 1E). *Cleome rosea* seeds are also pale yellow to dark brown and cochlear. They present vesicular aril and tegument with crusts and transversal ribs (Figure 1F). *Cleome dendroides* has brown orbicular seeds. They are appanate, with papilose and muricate surface with finger-shape extensions (Figure 1G). Figure 1H shows *C. dendroides* seed internal structure. Embryos are cotyledon-type with flat, folded and overlapping cotyledons. They present slightly larger thickness than the radicle-hypocotyl axis.

All species had viability higher than 80% and moisture content ranged from 6% to 15% (Table 1). Imbibition curves showed a fast imbibition phase up to the first two hours, with seeds water content reaching around 55%-60% (data not shown), demonstrating high seed-coat permeability.

The substrate and the use of constant or alternate temperatures had no effect on GR in *C. dendroides* (Table 2). Lowest GT values and highest GV values were reached on sand and paper. *Cleome rosea* germination was significantly influenced by the different substrates. Highest values of GR were obtained in vermiculite, although no statistical differences were observed on GT and GV. The use of alternate temperatures was an essential condition to seed germination

in *C. spinosa*. As observed in *C. dendroides*, lowest GT values and highest GV values were reached in sand and paper. In the three species, the germination was observed both in the presence and absence of light.

When considering all physical conditions evaluated, it was

found that *C. dendroides* and *C. spinosa* seeds had the highest germination capacity, showing GR values above 90%, while GR values for *C. rosea* stayed below 80%. In addition, in all species, seedling development was superior in vermiculite (Figures 2A-C). No abnormal seedlings were observed in all tested conditions.

Table 1. Characterization of fruits and seeds in different species of the genus *Cleome*.

Plant Material	Variables	Species		
		<i>C. dendroides</i>	<i>C. rosea</i>	<i>C. spinosa</i>
Fruits	Length (cm)	6.5 ± 2.1	9.0 ± 2.5	17.0 ± 2.0
	Thickness (cm)	1.5 ± 0.5	0.8 ± 0.4	1.35 ± 0.2
	Shape	Siliqua-shaped capsules	Siliqua-shaped capsules	Siliqua-shaped capsules
	Color	Greenish to pale brown	Greenish	Pale yellow to brown
Seeds	Length (mm)	2.04 ± 0.07	1.49 ± 0.32**	2.34 ± 0.24**
	Thickness (mm)	1.19 ± 0.09	1.09 ± 0.30**	1.35 ± 0.22**
	Shape	Orbicularis	Cochlear	Kidney-like to cochlear
	Color	Brown	Pale yellow to dark brown	Pale yellow to dark brown
	Fresh weight (mg)	2.73 ± 0.15*	1.00 ± 0.20**	2.00 ± 0.04**
	Dry weight (mg)	2.34 ± 0.21*	0.94 ± 0.15**	1.70 ± 0.03**
	Moisture (%)	12.17 ± 4.20	6.00 ± 2.40**	15.00 ± 1.30**
	Visibility (%)	90 - 100	80 - 90**	90 - 100**
	Coat permeability	High	High	High
	Number per fruit	380 ± 55	90 ± 15	139 ± 20

*average weight of five seeds.

** dark brown seeds.



Figure 1. Morphological aspects of fruits and seeds of the genus *Cleome*: A - fruit of *C. rosea*; B - fruit of *C. dendroides*; C - fruit of *C. spinosa*; D - seeds of *C. rosea* still attached to replum; E - seed of *C. spinosa*; F - seed of *C. rosea*; G - seed of *C. dendroides*; H - the internal structure of *C. dendroides* seed (a - extensions of testa; b - testa; c - endosperm; d - hilum; e - hypocotyl-radicle axis). Scale bars: 1 cm.

Table 2. Effect of temperature and substrate on germination rate (GR), mean germination time (GT), and coefficient of velocity of germination (GV) in species of the genus *Cleome*.

Parameters	Substratum	<i>Cleome</i>											
		<i>C. dendroides</i>			<i>C. rosea</i>			<i>C. spinosa</i>			Temperature (°C)		
		20	25	20-30	20	25	15-25	20-30	20	25	15-25	20-30	
GR (%)	Paper	96.7a	96.7a	96.7a	60.0b	33.3bc	66.6b	26.6c	0b	0b	100a	96.7a	
	Sand	93.3a	100a	93.3a	66.6b	40.0bc	46.6bc	53.3b	0b	0b	96.7a	96.7a	
	Vermiculite	96.7a	100a	96.7a	80.0a	33.3bc	73.3a	80.0a	6.6b	0b	93.3a	90.0a	
GT (days)	Paper	9.8b	7.3c	7.4c	13.1b	16.4b	15.7b	23.8a	-	-	2.9c	3.1c	
	Sand	9.3b	6.8c	7.3c	18.2b	17.2b	27.6a	20.2a	-	-	2.5c	3.2c	
	Vermiculite	12.9b	10.2b	15.2a	14.7b	13.6b	22.9a	28.8a	11.5a	-	-	5.7b	4.0b
GV (days)	Paper	0.10b	0.14a	0.13a	0.08a	0.06a	0.06a	0.04b	-	-	0.35a	0.32a	
	Sand	0.11b	0.15a	0.14a	0.06a	0.06a	0.04b	0.05b	-	-	0.40a	0.45a	
	Vermiculite	0.09b	0.10b	0.06c	0.07a	0.07a	0.04b	0.04b	0.10c	-	0.18b	0.25b	

Means of each parameter evaluated for each species followed by the same letter do not differ by Tukey test (5%).
- no germination.



Figure 2. *In vivo* and *in vitro* germination of *Cleome*. *In vivo* germination of *C. dendroides*, at 25 °C, on different substrates: A - paper; B - sand; C - vermiculite. *In vitro* germination: D - *C. dendroides*; E - *C. spinosa*; F - *C. rosea*. Scale bars: 1 cm.

The relative frequency polygons for germination, which determine the proportion of seeds germinated daily (Figure 3), showed that *C. spinosa* seeds presented the fastest germination when kept in alternate temperatures (Figure 3A). In this species, radicle protrusion took place at 1 - 3 days, on paper and sand. Maintenance of *C. dendroides* seeds in alternate temperatures of 20-30 °C or in constant temperature of 25 °C, accelerated radicle protrusion, which took place around the seventh day, on paper and sand (Figure 3B). These results showed that both *C. spinosa* and *C. dendroides* have a synchronic germination process. *Cleome rosea* showed a delayed and intermittent germination, in some cases, the

beginning of the process occurred after 40 days (Figure 3C).

Germination under *in vitro* conditions was successfully established to *C. dendroides* and *C. spinosa*, but it was not efficient to *C. rosea*. The exposure of seeds to formaldehyde saturated atmosphere was more efficient protocol of decontamination when compared to the immersion in sodium hypochlorite solution. To *C. dendroides*, three hours exposure to formaldehyde resulted in an efficient decontamination level (100%) and in GR of 100%. The use of sodium hypochlorite (2.5% for 20 min) allowed low contamination (10%), seeds showed lower GR (90-95%) and delayed the

start of germination process. Similar results were observed in *C. spinosa*. Decontamination in formaldehyde atmosphere for 1 h resulted in GR above 80%, while the best results

obtained with sodium hypochlorite (1.5%, 20 min) were 48%. To *C. rosea* the highest GR (85%) was reached with sodium hypochlorite at 1% for 10 min.

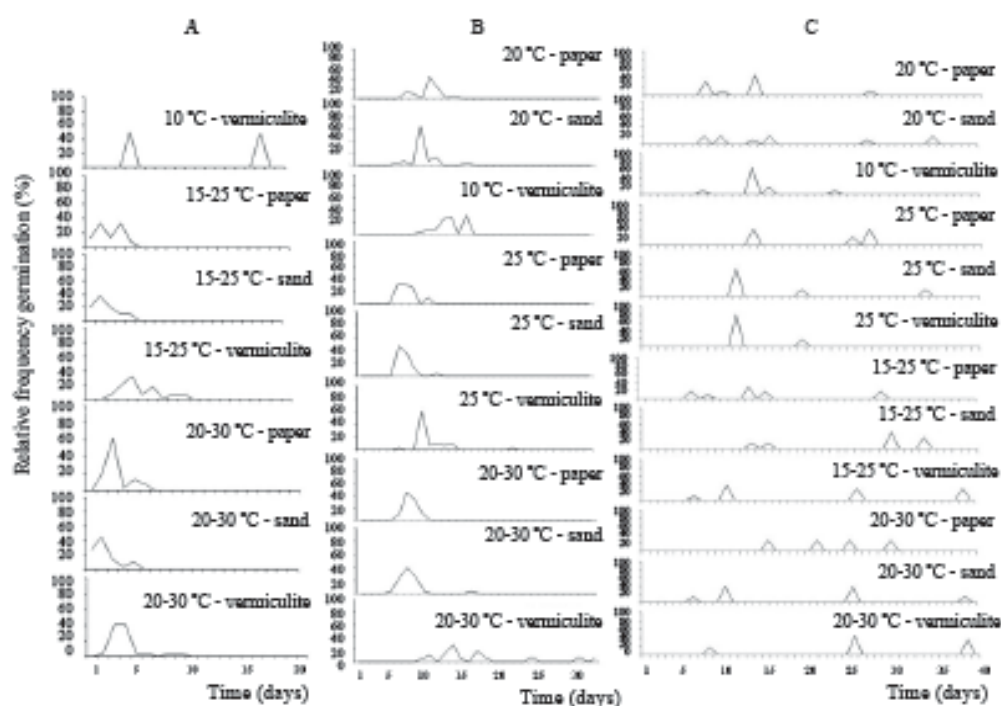


Figure 3. Relative frequency polygon from the germination of *C. spinosa* (A), *C. dendroides* (B) and *C. rosea* (C) under different temperatures and substrates.

After decontamination, seeds were inoculated on MS medium in regular or with reduced salt concentration (MS1/2 and MS1/4). *Cleome dendroides* seedlings showed hyperhydricity on MS medium, but developed normally on MS1/4 (Figure 2D). Germination occurred both in constant (26 ± 2 °C) and alternate (20-30 °C) temperatures. As for *C. spinosa*, salt concentration had no influence on seedling development (Figure 2E) and alternate temperatures were required for germination.

In vitro germination of *C. rosea* resulted in seedlings presenting an intense callusing in folioles, cotyledons and stem (Figure 2F). To establish healthy seedlings new assays were performed with modifications on culture conditions, however the new conditions did not prevent callus formation and, in addition, glucose caused a decrease in GR (60%) and seedlings size.

Cleome dendroides in vivo germination started after around seven days, with radicle protrusion, which breaks the tegument in the hilum (Figure 4B). After nine days, primary root was white, cylindrical, thin, and reached 8 mm (Figure

4C). On the day 11, hypocotyl growth was faster than the root, showing cylindrical shape and bright green color. In this stage, the cotyledons are carried above the soil surface by the elongating hypocotyl (Figure 4D) characterizing the epigeal germination. Around day 12, cotyledons were free from the tegument, which is typical of phanerocotyledonous germination. The cotyledons were orbicularis (diameter 0.5 cm), opposite, glabrous, dark green on the adaxial surface and bright green on the abaxial surface, entire margin and 1 cm petiole. Cotyledon expansion was observed on the day 13 (Figure 4E). At this stage, hypocotyl elongation ceased (1.5 - 2.0 cm) and it was observed the development of a root system of the axial type, with cylindrical, thin, hairy and white secondary roots (Figure 4F). Epicotyl was recorded around day 25. It was cylindrical and bright green. Around day 30, the pair of primary leaves was formed. Cotyledons abscission occurred after about 35 days. The young plant, after 40 (Figure 4G), presented the pair of opposite primary leaves, trifoliate, membranous, and oblong-elliptical leaflets with

attenuated base, obtusely acuminate at apex, smooth edges, pubescent adaxially and slightly pubescent on the abaxial surface with printed rib on the adaxial and prominent on the abaxial surface, dark green on the adaxial and bright green

on the abaxial surface, but more clear than the cotyledons. Central leaflets were larger than lateral ones. The cylindrical petioles had about 0.8 cm, leaflets were sessile and the axial root system become fully established.

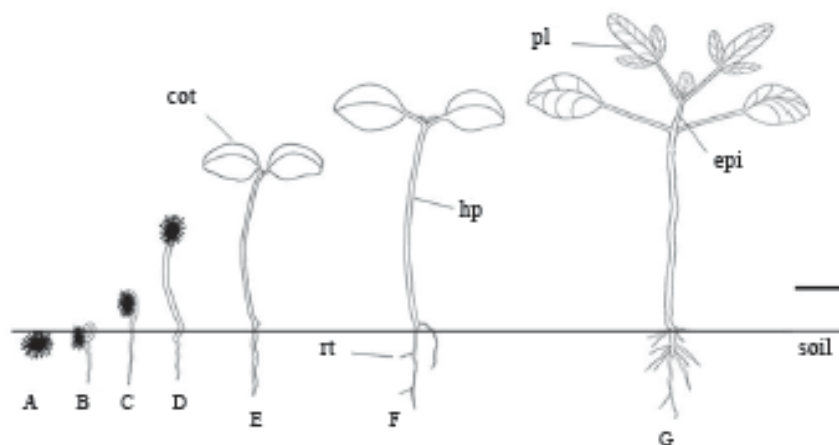


Figure 4. Morphological aspects of *in vivo* germination of *C. dendroides*, in sand, at 25 °C: A - seed; B - 7 days after primary root protrusion; C - 9 days; D - 11 days; E - 13 days; F - 20 days; G - 40 days. cot - cotyledon; hp - hypocotyl; rt - root; pl - primary leaves; epi - epicotyl. Scale bars: 4 mm.

Cleome spinosa *in vivo* germination took place around day 3. On day 5, primary root reached 0.5 cm and hypocotyl with the same dimensions. Hypocotyl was bright green and cylindrical. During its development, elevated foliar cotyledons already released the tegument, characterizing the epigeal germination. Around the day 15, the epicotyl (0.2 cm) was formed. On day 20, the first pair of membranous and trifoliate leaves was established and after 30 days the second pair of leaves with alternate phyllotaxy was formed. The compound leaves presented the central leaflets larger than the lateral ones.

Cleome rosea *in vivo* germination was observed 7 - 9 days after sowing. From day 10 hypocotyl entered a period of active growth, stretching and elevating the cotyledons above the substrate characterizing the epigeal germination. On day 15 the early development of the epicotyl and first pair of leaves were observed. Between 18 and 20 day, first pair of trifoliate leaves was formed and after 40 days they possessed a bright-green, glabrous stem axis consisting of the hypocotyl (3.5 cm) and epicotyl (3.8 cm) and two pairs of trifoliate leaves. At day 60, plants had an axial root system, well developed, with many secondary roots and three pairs of compound leaves, arranged in alternate phyllotaxy, with membranous and hairy leaflets, with entire margin and bright green color. Central leaflets were larger than the laterals.

Cleome dendroides *in vitro* germination took place after 7-8 days of culture, by the rupture of the tegument in the hilum and root protrusion. After 8 days, hypocotyl differentiation and primary root elongation occurred. After 9 days, the tegument remained adhered to the cotyledons and hypocotyl elongation occurred. The emergence and expansion of cotyledons was observed after 9 - 10 days. The pair of primary leaves emerged around day 17 and epicotyl and secondary roots around the day 20. After 25 days, the seedling had all the essential structures: roots, hypocotyls, cotyledons and epicotyl with the pair of primary leaves expanded.

The start of *C. spinosa* *in vitro* germination took place after 1 - 2 days after inoculation. Hypocotyl and primary root developed after three days. The elevation of foliaceous cotyledons occurred after 5 days and epicotyl was formed after 7 days. The first pair of membranous and trifoliate leaves was observed after 12 days and the visualization of the second pair of leaves occurred after 18 days.

Mature fruits of both *C. rosea* and *C. spinosa* contained seeds of varying color and size, prevailing dark brown seeds with larger dimensions, higher dry weight, and lower moisture. Considering *C. dendroides* seeds they are only brown. The analyzed lots showed moisture content ranging from 6 to 15%. Tegument color, along with these other characteristics,

may provide data on the quality of the seed lot (Ochudho and Modi, 2010). Physiological maturity of seeds is associated with low moisture content and at this stage, seeds reach maximum germination (Black et al., 2006). Thus, dark brown seeds of all species evaluated were considered fully mature.

The topographical tetrazolium test enables fast and efficient determination of the percentage of viable seeds, especially those that present dormancy, the recalcitrant and species that require long time to germinate in laboratory (Brasil, 2009). This test is routinely used in quality control programs for various species (Carvalho et al., 2013). The TTC test results showed seed viability ranging from 80 to 100% and the high viability of the lots was confirmed in germination tests.

Considering the tegument permeability, the results indicated that *Cleome* seeds do not exhibit dormancy in the tegument (physical dormancy) since it presented no resistance to water entry. Physical dormant seeds restrict imbibition by different mechanisms, such as the presence of one or more layers of lignified palisade cells on the tegument, making it impermeable (Baskin and Baskin, 2001).

The influence of substrate and temperature on the germination process showed that the optimum conditions varies among the species evaluated. The substrate influenced most significantly the germination in *C. rosea*, while for *C. spinosa* the alternating temperature was an essential condition. On the other hand, *C. dendroides* reached high germination rates in all conditions tested. Some species of the genus *Cleome* present no dormancy and germinate without the need of pretreatment. *Cleome amblyocarpa* germinates in the absence of light, and 25 °C was considered the ideal temperature, with germination percentage of 81% (Tlig et al., 2012). However, several species of *Cleome* exhibit physiological dormancy. Ekpong (2009) studying *C. gynandra* observed germination rate of 17.3% in freshly harvested seeds, at alternate temperatures (20 - 30 °C), without any pre-germination treatment. According to the author, the species requires a post-maturation period of three months, at environment temperature in order to break dormancy, after what germination rates were at 90%. Physiological dormancy was also reported for *C. lutea* (Cane, 2008), *C. serrulata* (Cane, 2008) and *C. hassleriana* (Raboteaux and Anderson, 2010).

In the present study the germination process was not influenced by light, characterizing the *Cleome* seeds as neutral photoblastic. However, experiments carried out to evaluate the influence of temperature and light on germination of *C. gynandra* from Africa (Ochudho and Modi, 2007) concluded that the species showed photoinhibition. The authors recommend that germination should be performed in

the absence of light and/or alternate temperature of 20-30 °C.

Presented results show that *C. spinosa* needs the breaking of physiological dormancy in order to germinate, and this can be achieved with the use of alternate temperatures. This is in contrast to what was observed in *C. dendroides* and *C. rosea* that showed no dormancy. Alternate temperatures may favor dormancy breaking, by modulating hormone synthesis, altering endogenous levels and influencing seed germination (Black et al., 2006).

Germination was synchronic in *C. spinosa* and *C. dendroides* and asynchronous in *C. rosea*. Asynchronous germination leads to a wider distribution in seed germination time, which enhances the species' chances of survival under natural conditions by favoring the formation of seed banks (Baskin and Baskin, 2001). Among the studied species, *C. rosea* is the only that occurs in restinga, coastal ecosystems characterized by elevated temperatures and saline sandy soils. These abiotic features may require longer germination periods to ensure the species' establishment success. Asynchrony may be attributed to environmental oscillations during seed formation, as well as between individual intrinsic genetic variability within populations. Zamith and Scarano (2004), analyzing seedling production in species from Rio de Janeiro's restingas, observed large amplitude in germination time requirement.

In vitro conditions promote continuous physiological stress, which sometimes leads to hyperhydricity. Hyperhydric plants or buds present turgid, thick, wrinkled, twisted, translucent, with glass appearance, pale green stems and leaves, rigid and easily breakable. Shoots with shortened internodes and this morphological appearance suggest that water is in excess. The type of sealing may reduce or control the water on the atmosphere of culture flasks (Vasconcelos et al., 2012). In this present study, hyperhydricity was observed in plants of *C. dendroides* kept on MS medium, and the type of sealing showed no influence on its prevention. *In vitro* germination of *C. dendroides* was achieved on MS% medium with high GR yields. Besides the relative humidity, the concentration and type of gelling agent, and growth regulators, must be controlled to avoid hyperhydricity (Vasconcelos et al., 2012). The decrease in salt concentration, in particular of ammonium ions, may also be effective in preventing hyperhydricity (Guerra and Nodari, 2006), as seen in *C. dendroides*. The germination process under *in vitro* conditions of *C. rosea* seeds was not efficient. Despite the high percentage (85%) of seed germination in MS medium, plants presented low development of stem axis when compared to plants germinated *in vivo*. Callus formation was observed over the entire surface of the leaves.

The use of glucose as carbon source reduced germination

efficiency in comparison to sucrose. Carbohydrates play an important role in maintaining proper osmolarity on culture medium, as well as serving as nutrient source. The low germination percentage of *C. rosea* seeds inoculated in medium supplemented with glucose could be the result of an inadequate osmolarity to allow proper water exchange between the medium and seeds.

Calli observed in *C. rosea* leaves may be related to the presence of ethylene in the culture flasks. Under *in vitro* conditions ethylene may be produced after the buckling as a byproduct of combustion accumulating in vials. George (2008) reported the formation of callus-like structures on leaves and stems of intact plants kept on *in vitro* conditions, when they were maintained in ethylene enriched atmosphere for a prolonged time. The stimulation of cell division observed in *C. rosea* leaves and consequent callus formation may also have been due to auxin accumulation in their synthesis sites or in close regions, caused by the antagonistic action of ethylene on polar auxin transport (George, 2008). No reduction in leaf callogenesis was observed when flasks sealed with lids that allow greater gas exchange. According to Armstrong et al. (1997), only a forced ventilation system was able to significantly reduce ethylene levels inside culture flasks. Considering the possibility that *C. rosea* has a high sensitivity to ethylene, new methods to decrease its concentration in culture flasks must be employed in order to develop an effective protocol for germination the species under *in vitro* conditions.

During post-seminal development of *C. dendroides* and *C. spinosa*, it was observed faster development *in vitro* in comparison to *in vivo* conditions, which may be due to carbon supply (sucrose) and other nutrients present in culture medium, in addition to natural seed reserves.

Conclusions

The present study shows that optimal conditions for the germination are different for each of the species. *Cleome spinosa* has physiological dormancy, while *C. dendroides* and *C. rosea* do not exhibit dormancy under *in vivo* conditions. The different stages of *in vivo* post-seminal development of the three species are defined. In addition, an effective methodology for *in vitro* germination, enabling the providing of material to experiment on plant tissue culture is established to *C. dendroides* and *C. spinosa*.

Acknowledgements

The authors thank the technical support of Maria Francisca Santoro de Assunção (PROATEC/UERJ) and Adriana Maria

Lanziotti (Qualitec/UERJ). The authors also thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for providing financial support.

References

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.17, p.114-140, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a21v17n1.pdf>
- ALBARELLO, N.; SIMÕES, C.; ROSAS, P.F.G.; CASTRO, T.C.; GIANFALDONI, M.G.; CALLADO, C.H.; MANSUR, E. *In vitro* propagation of *Cleome spinosa* (Capparidaceae) using explants from nursery-grown seedlings and axenic plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v.42, p.601-606, 2006. <http://link.springer.com/article/10.1079%2FIVP2006828>
- ALBARELLO, N.; RIBEIRO I.G.; SIMÕES, C.; CASTRO, T.C.; GIANFALDONI, M.G.; CALLADO, C.H.; KUSTER, R.M.; COELHO, M.G.P.; MANSUR, E. Histological analysis of calluses from *in vitro* propagated plants of *Cleome spinosa* Jacq. *Brazilian Journal of Biociências*, v.5, p.699-701, 2007. <http://www.ufrgs.br/searbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/599/504>
- ALBARELLO, N.; SIMÕES-GURGEL, C.; CASTRO, T. C.; GAYER, C.R.M.; COELHO, M.G.P.; MOURA, R.S.; MANSUR, E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of field growth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.7, p.1043-1049, 2013. http://www.academicjournals.org/article/article1380718349_Albarello%20et%20al.pdf
- APARADH, V.T.; MAHAMUNI, R.J.; KARADGE, B.A. Taxonomy and physiological studies in spider flower (*Cleome species*): a critical review. *Plant Sciences Food*, v.2, p. 25-46, 2012. http://www.academia.edu/2054889/taxonomy_and_physiological_studies_in_spider_flower_cleome_species_a_critical_review
- ARMSTRONG, J.; LEMOS, E.E.P.; ZOBAYED, S.M.A.; JUSTIN, S.; ARMSTRONG, W. A humidity-induced convective through flow ventilation system benefits *Amnion squamosa* L. explants and coconut calloid. *Annals of Botany*, v.79, p.31-40, 1997. <http://nob.oxfordjournals.org/content/79/1/31.full.pdf+html>
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. *Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. 1.ed. San Diego: Academic Press, 2001, 666p.
- BLACK, M. J.; BEWLEY, J. D.; HALMER, P. *The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses*, 2006. 828p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para Análise de Sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA, 2009. 395p. <http://www.br.cca.ufsc.br/publicacoes/regras%20analise%20sementes.pdf>
- CANE, J.H. Breeding biologies, seed production and species-rich bee guilds of *Cleome lutea* and *Cleome serrulata* (Cleomaceae). *Plant Species Biology*, v.23, p.152-158, 2008. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-1984.2008.00224.x/pdf>

- CARVALHO, T.C.; KRZYZANOWSKI, F.C.; OHLSON, O.C.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. *Journal of Seed Science*, v.35, p.361-367, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S2317-15372013000300013>
- EKPONG, B. Effects of seed maturity, seed storage and pregermination treatments on seed germination of *Cleome* (*Cleome gynandra* L.). *Scientia Horticulturae*, v.119, p.236-240, 2009. http://sc.sls-cdn.com/S0304423808003324/1-v2.0-S0304423808003324-main.pdf?tid=f2a3b83a-1d5b-11e4-863c-00000aab0f01&acdnat=1407324327_d06ff8bd17e82982ca36aac8c709ac38
- GEORGE, E.F. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; CLERK, G.J. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. v.1 The background Springer: The Netherlands, 2008. 479p.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. *Apostila de Biotecnologia – LFDGV/CCA/UFSC*. Florianópolis: Edição da Steinmetzbar, 2006, 41pp. <http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>
- ILTS, H.H. Studies in the Capparidaceae. VII. Old World *Cleome* adventive in the New World. *Brittonia*, v.12, p.279-294, 1960. <http://www.jstor.org/discover/10.2307/2805120?uid=3737664&uid=2&uid=4&sid=21104635229631>
- K'OPONDO, F.B. Morphological characterization of selected spider plant (*Cleome gynandra* L.) types from western Kenya. *Annals of Biological Research*, v.2, p.54-64, 2011. <http://scholarresearchlibrary.com/ABR-vol2-iss2/ABR-2011-2-2-54-64.pdf>
- LABOURIAU, L.G. *A germinação das sementes*. Washington: Secretaria de OEA, 1983. 173p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- OCHUODHO, J.O.; MODI, A.T. Light-induced transient dormancy in *Cleome gynandra* L. seeds. *African Journal of Agricultural Research*, v.2, p.587-591, 2007. http://www.academicjournals.org/article/article1380898274_Ochudho%20and%20Modi.pdf
- OCHUODHO, J.O.; MODI, A.T. Association of seed coat colour with germination of three wild mustard species with agronomic potential in Second RUFORUM Biennial Meeting Entebbe, 229-232p. 2010. <http://news.usk.ac.ug/documents/RUFORUM/Ochudho.pdf>
- RABOTEAUX, N.N.G.; ANDERSON, N.O. Germination of *Cleome hassleriana* and *Polantia dodocandra* seed lots in response to light, temperature and stratification. *Research Journal of Seed Science*, v.3, p.1-17, 2010. <http://scialart.net/fulltext?doi=rjs.2010.1.17&org=10>
- SIMÕES, C.; SANTOS, A.S.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from stem explants of *Cleome rosea* Vahl (Capparidaceae). *Journal Plant Biotechnology*, v.6, p.199-204, 2004. http://210.101.116.28/W_files/kiss2/05801997_pp.pdf
- SIMÕES, C.; MATTOS, J.C.P.; SABINO, K.C.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; COELHO, M.G.P.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L. Medicinal potential from *in vivo* and acclimatized plants of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparidaceae). *FitoTerapia*, v.77, p.94-99, 2006. http://www.researchgate.net/publication/7393807_Medicinal_potential_from_in_vivo_and_acclimatized_plants_of_Cleome_rosea
- SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; CASTRO, T.C.; MANSUR, E. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* root cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.98, p.79-86, 2009a. <http://link.springer.com/article/10.1007/s1240-0099540-z>
- SIMÕES, C.; BIZARRI, C.H.B.; CORDEIRO, L.S.; CASTRO, T.C.; COUTADAL, C.M.; SILVA, A.R.J.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESI-MS. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.47, p.895-903, 2009b. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942809001466>
- SIMÕES, C.; CASTRO, T.C.; CORDEIRO, L.S.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E.; ROMANOS, M.T.V. Antiviral activity of *Cleome rosea* extracts from field-grown plants and tissue culture-derived materials against acyclovir-resistant Herpes simplex virus type 1 (ACVr-HSV-1) and type 2 (ACVr-HSV-2). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.26, p.93-99, 2010b. <http://link.springer.com/article/10.1007/s1274-009-0147-7#page-1>
- SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C.H.; CASTRO, T.C.; MANSUR, E.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.53, p.679-686, 2010a. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132010000300024
- SIMÕES-GURGEL, C.; ROCHA, A.S.; CORDEIRO, L.S.; GAYER, C.R.M.; CASTRO, T.C.; COELHO, M.G.P.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E.; ROSA, A.C.P. Antibacterial activity of field-grown plants, *in vitro* propagated plants, callus and cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Journal of Pharmacy Research*, v.5, p.3304-3308, 2012. <http://connection.abscobhost.com/c/articles/84424609/antibacterial-activity-field-grown-plants-vitro-propagated-plants-callus-cell-suspension-cultures-cleome-rosea-vahl>
- TLIG, T.; GORAI, M.; NEFFAT, M. Factors influencing seed germination of *Cleome amblyocarpa* Barr. & Murr. (Capparidaceae) occurring in southern Tunisia. *Revue d'Ecologie - La Terre et la Vie*, v.67, p.305-312, 2012. [http://www.researchgate.net/publication/235220501_Factors_influencing_seed_germination_of_Cleome_amblyocarpa_Barr._Murr._\(Capparidaceae\)_occurring_in_southern_Tunisia](http://www.researchgate.net/publication/235220501_Factors_influencing_seed_germination_of_Cleome_amblyocarpa_Barr._Murr._(Capparidaceae)_occurring_in_southern_Tunisia)
- VASCONCELOS, A.G.V.; TOMAS, L.F.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. *Ciência Rural*, v.42, p.837-844, 2012. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782012000500013&script=sci_arttext
- ZAMITH, L.R.; SCARANO, F.R. Produção de mudas de espécies das Restingas do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, v.18, n.1, p.161-176, 2004. <http://www.scielo.br/pdf/abb/v18n1/v18n1a14.pdf>