



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

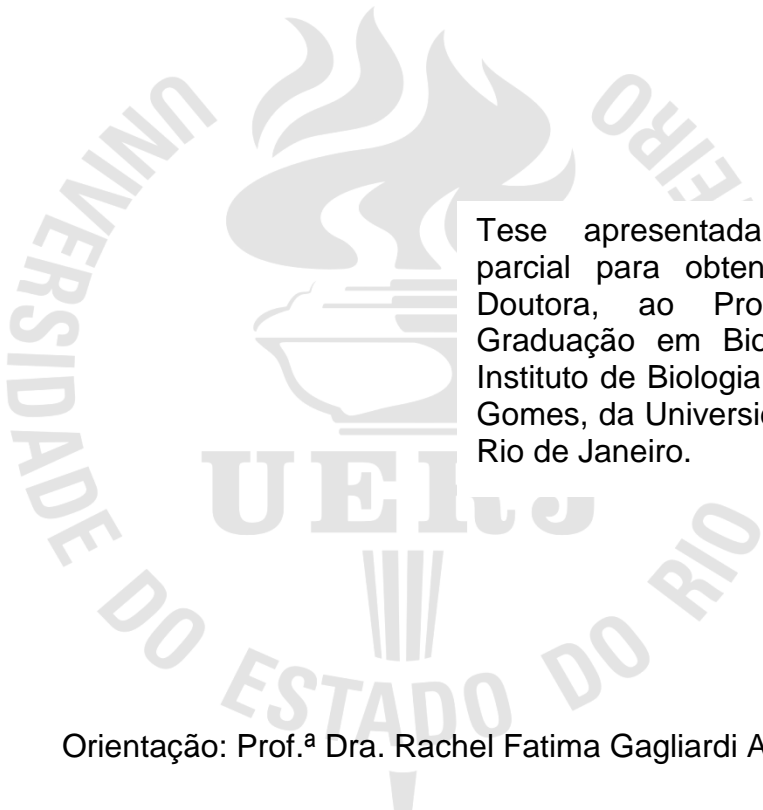
Bianka de Oliveira Soares

Cultura de tecidos e monitoramento da estabilidade genética e metabólica de plantas de *Petiveria alliacea* L. produzidas e conservadas *in vitro*

Rio de Janeiro
2016

Bianka de Oliveira Soares

Cultura de tecidos e monitoramento da estabilidade genética e metabólica de plantas de *Petiveria alliacea* L. produzidas e conservadas *in vitro*



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

Orientação: Prof.^a Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo

Rio de Janeiro

2016

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

S676 Soares, Bianka de Oliveira.
Cultura de tecidos e monitoramento da estabilidade genética e metabólica de plantas de *Petiveria alliacea* L. produzidas e conservadas *in vitro* / Bianka de Oliveira Soares. - 2016.
146f. : il.

Orientadora: Rachel Fatima Gagliardi Araujo.
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Inclui bibliografia.

1.Plantas medicinais - Teses. 2.Petiveria alliaceae - Propagação-in-vitro - Teses. 3. Análise cromatográfica - Teses. I. Araujo, Rachel Fatima Gagliard. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III.Título

CDU 633.88

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

Assinatura

Data

Bianka de Oliveira Soares

Cultura de tecidos e monitoramento da estabilidade genética e metabólica de plantas de *Petiveria alliacea* L. produzidas e conservadas *in vitro*

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

Aprovada em 30 de junho de 2016

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes- UERJ

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

Prof. Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage
Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira
Fundação Instituto Osvaldo Cruz – FIOCRUZ

Prof.^a Dra. Samara Cristina Ferreira Machado
Universidade Federal Fluminense – UFF

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe, pelo incentivo e carinho demonstrados durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado me iluminando, me guardando e me abençoando em todos os momentos da minha vida.

Ao PGBV/UERJ pela oportunidade de realizar este trabalho e melhorar minha qualificação profissional.

Ao Inovuerj, pela concessão da bolsa e formalização do Laboratório de Marcadores Moleculares em Plantas (LMMP), onde foram realizadas as técnicas moleculares.

A Prof^a Elisabeth Mansur, coordenadora do Laboratório Micropropagação e Transformação de Plantas (Labmit/ UERJ), onde foi realizada a maior parte deste trabalho.

Ao Prof Adriano Caldeira de Araujo (*in memorium*), e aos professores José Carlos P. de Mattos e Flávio S. Dantas, pela colaboração e carinho desde o mestrado. Agradeço também à equipe do Laboratório de Rádio e Fotobiologia da UERJ (DBB/UERJ): Cláudia Ribeiro, Márcia Bethânia pela ajuda ao longo deste trabalho, e à Verônica Maciel, Bruna Barros e Luana Brito pelo companheirismo.

À Prof^a Norma Albarello e toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), particularmente à Cláudia Simões, Tatiana Carvalho e Lívia Cordeiro, pela ajuda, ao longo desses anos.

Ao Prof. Alexandre Gabriel Christo (*in memorium*), pela colaboração no início do trabalho, com a identificação taxonômica das amostras e o estudo da diversidade genética.

À Prof^a Marsen Coelho pela colaboração inicial na análise fitoquímica e disponibilização da infraestrutura laboratorial do Depto. de Bioquímica da UERJ.

Ao Prof. Florent Engelmann do *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD), França, que tive a honra de conhecer e colaborar na criopreservação.

Ao farmacêutico Eduardo Fonseca do Laboratório de Cromatografia do NBV/UERJ e à Prof^a Mônica Marques da Central Analítica Fernando Coutinho da UERJ, pelas análises fitoquímicas, fundamentais na conclusão desse trabalho.

À Prof^a Cátia Callado do Laboratório de Anatomia Vegetal pela colaboração nas análises histológicas.

À equipe do Labmit/ UERJ, por todos esses anos junto, foram muitas lembranças, risadas e desesperos, obrigada a todos, vocês são responsáveis por tornar os meus dias mais felizes, afinal, passamos mais tempo juntos do que com as nossas famílias, tenho um carinho enorme por todos vocês. Nathália Falsia, Marcela Vianna, Ana Ferreira, Isabela Brandão, Tayanne Felipe, Rafaela Caruso, Ana Carolina Madeira, Marina Kaiate, Beatriz de Souza (passando uma temporada no Canadá, boa sorte!), Raphaela Tierno, uma afilhada que ganhei e pela qual tenho um carinho imenso, e não poderia esquecer dos únicos meninos do laboratório, Gabriel, que dividiu o espaço com o Leonardo por algum tempo, obrigada por tornarem o ambiente mais divertido.

À equipe Petiveria/abajerú, quantas lembranças...éramos somente duas, Leila Cantelmo e eu...como crescemos! Agradeço a todos pelo carinho e dedicação que tiveram com o trabalho, alguns seguiram outros caminhos, mas deixaram a sua marca e lembranças, Raquel Mattos, Juliana Cochofel, Nathália Miguel, Maria Carolina Cigliato, Luiz Gustavo, Mariana Pimenta, muito obrigada, vocês foram muito importantes, assim como os recém-chegados, Washington Gil, Alexia Gonçalves, Rubens Castilho, Beatriz Silva, Karoline Lacerda e Vinícius Souza, bem vindos!

À Camila Castanon, companheira do LMMP, agradeço muito pela ajuda na etapa final do trabalho, muitas vezes saindo tarde, fechando “aquele” experimento que lembrei na última hora e outras um pouco mais cedo (“santos” bares da Sans Peña).

Não poderia me esquecer da grande amiga Jamine Pettinelli (ela me mataria se isso acontecesse). Ex-estagiária, que se perdeu por um tempo no Jardim Zoológico, mas não resistiu e voltou para o grupo e hoje já é aluna de doutorado. Obrigada por

sempre aceitar os meus desafios, que na verdade nunca vão parar, e você está de parabéns! Os bolos que faz são maravilhosos!!! E não podia deixar de falar das nossas idas, após terminar os experimentos, que fique bem claro, aos bares da Praça Sans Peña... Obrigada!

À Mariela Simão (Mari), figuraça de Muriaé que se adaptou muito bem à equipe e ao Rio de Janeiro. Obrigada pela ajuda e pelas risadas durante esses últimos anos.

À Carla Manão, amiga da pós, por tornar os meus dias no LMMP mais divertidos. Foram anos de muitas risadas e de muitos desesperos, mas valeu a pena. Vamos continuar colaborando, tá? E não esqueça da “Cuca de banana”....

Às amigas Georgia Pacheco e Renata Garcia, não tenho nem palavras, meninas maravilhosas que Deus me presenteou, obrigada por tudo, pelo carinho, paciência, aprendizado, viagens, foram tantos anos, que não vou contar..... Um beijo no coração de vocês.

Ao Técnico Gilson Fernando, sempre pronto a ajudar nas tarefas do dia-a-dia. Muito obrigada por tudo.

Agradeço de coração à minha mãe e ao meu irmão, por estarem sempre me apoiando nas minhas realizações, e ao meu sobrinho e afilhado Arthur por me animar a cada escrita, querendo me ajudar.

Encerro essa lista de agradecimentos com a pessoa mais importante desse trabalho, minha orientadora, Rachel Gagliardi. Já faz alguns anos, desde a graduação para ser mais exata, que só tenho a agradecer por cada aprendizado, conversas, risadas, viagens. Obrigada Rachel, essa conquista também é sua.

Você nunca sabe que resultados virão da sua ação, mas se você não fizer nada,
não existirão resultados.

Autor desconhecido

RESUMO

SOARES, B.O. **Cultura de tecidos e monitoramento da estabilidade genética e metabólica de plantas de *Petiveria alliacea* L. produzidas e conservadas *in vitro***. 2016. 146 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta importante para a produção e/ou conservação de germoplasma e metabólitos. Este trabalho teve como objetivos estabelecer sistemas de cultura de tecidos e criopreservação de *Petiveria alliacea*, espécie com importantes propriedades medicinais, muito utilizada na medicina popular e rituais afro-brasileiros. Foram estudadas populações de plantas de cinco regiões do estado do Rio de Janeiro. Visando ao controle do material produzido e conservado *in vitro*, foram estabelecidas metodologias de monitoramento da variabilidade genética, por meio de marcadores moleculares, fitoquímicos e dos efeitos genotóxicos e/ou antígenotóxicos dos extratos. Dentre os diferentes métodos aplicados para a produção de clones, (i) a multiplicação a partir de ápices caulinares em resposta a diferentes citocininas, em diferentes concentrações, forneceu cerca de 4-5 plantas por explante dependendo da população e do tipo de citocinina utilizada; (ii) embriões somáticos foram induzidos com diferentes fitorreguladores, direta e indiretamente, a partir de folhas e raízes de plantas *in vitro*, apresentando alto potencial de multiplicação e de conversão a plantas; (iii) culturas de raízes adventícias foram obtidas em resposta à diferentes concentrações de auxinas (AIA, ANA, AIB, 2,4D), sendo que raízes longas e individualizadas foram obtidas apenas na presença de AIB a 1,02 μM , ocorrendo a formação de “novelos” e embriões somáticos nos demais tipos e concentrações de auxinas utilizadas. O monitoramento fitoquímico, através de métodos cromatográficos, e o monitoramento molecular, através de RAPD, foram aplicados em materiais vegetais mantidos em campo e obtidos e conservados *in vitro*. Diferentes polissulfetos foram observados na análise por CLAE, em todos os materiais avaliados, constituindo-se bons marcadores biossintéticos para monitorar o material produzido e conservado *in vitro*. Na análise RAPD, foram determinados iniciadores capazes de identificar variedades genéticas entre as populações estudadas, além disso foram determinados nove iniciadores capazes de identificar polimorfismos entre os clones. A investigação dos efeitos tóxicos dos extratos aquosos no DNA plasmidial mostrou que estes foram capazes de induzir alterações na conformação estrutural do DNA, indicando a ocorrência de quebras, dependentes da concentração. Além disso, foi observado um efeito protetor contra os danos oxidativos causados pelo cloreto estânico, indicando também, um potencial antígenotóxico. Assim, o monitoramento genético, fitoquímico e biológico, realizado neste trabalho permitiu a caracterização e controle do germoplasma de *P. alliacea* produzido e conservado *in vitro*.

Palavras-chave: Guiné. Morfogênese *in vitro*. Embriogênese somática. Análise fitoquímica. Variação Somaclonal. Análises cromatográficas. RAPD.

ABSTRACT

SOARES, B.O. **Tissue culture and assessment of genetic and metabolic stability of *Petiveria alliacea* L. produced and maintained *in vitro***. 2016. 146f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Plant tissue culture is an important tool for germplasm and metabolites production and/or storage. This study aimed at the establishment of tissue culture and cryopreservation systems for *Petiveria alliacea*, an important medicinal species, which is widely used in folk medicine and African-Brazilian rituals. Plants from five populations from the state of Rio de Janeiro were studied. In order to control the materials produced and maintained *in vitro*, methodologies for assessing the genetic variability, through molecular markers, phytochemicals and the genotoxic and/or antigenotoxic effects of the extracts have been established. Among the different methods used for the production of clones, (i) the multiplication from shoot tips in response to different cytokinins, in different concentrations, provided 4-5 plants per explant, depending on the population and the type of cytokinin used; (ii) somatic embryos were induced with different growth regulators, directly and indirectly, from leaves and roots of *in vitro*-grown plants, displaying a high multiplication capacity and potential for conversion to plants; (iii) adventitious root cultures were obtained in response to different concentrations of auxins (IAA, NAA, IBA, 2,4-D), and long, individual roots were obtained only in the presence of 1.02 μM IBA, with the formation "skeins" and somatic embryos in response to the other types and concentrations of auxins. The assessment of phytochemical profile by chromatographic methods and molecular stability by RAPD were applied in plant materials maintained in the field or under *in vitro* conditions. Different polysulfides were observed by HPLC, in all evaluated materials, which were considered good biosynthetic markers for monitoring the material produced and maintained *in vitro*. In RAPD, primers were determined six primers able to identify genetic variations among the populations studied, furthermore were determined nine primers capable of identifying polymorphisms among clones were determined. The investigation of the toxic effects of the aqueous extracts on the plasmidial DNA showed that they were able to induce structural changes in DNA conformation, indicating the occurrence of breakages, depending on the concentration. In addition, a protective effect was observed against the oxidative damage caused by stannous chloride, also indicating a potential antigenotoxic effect. Thus, the assessment of the genetic, phytochemical and biological stability carried out in this work allowed the characterization and control of the germplasm of *P. alliacea* produced and maintained under *in vitro* conditions.

Keyword: Guinea. *In vitro* morphogenesis. Somatic embryogenesis. Phytochemical analysis. Somaclonal variation. Chromatographic analysis. RAPD

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Petiveria alliacea</i> L.....	21
Figura 2 -	Formação enzimática de tiosulfinaos em <i>Petiveria alliacea</i>	23
Figura 3 -	Polissulfetos de <i>P. alliacea</i>	24
Figura 4 -	Plantas de campo de <i>Petiveria alliacea</i> L. mantidas no telado do NBV/UERJ.....	36
Figura 5 -	Avaliação de produção de raiz <i>in vitro</i> em <i>P. alliacea</i>	40
Figura 6 -	Plantas <i>in vitro</i> de <i>Petiveria alliacea</i> L.....	47
Figura 7 -	Etapas de germinação de semente de <i>P. alliacea</i>	53
Figura 8 -	Indução de raízes em plantas de <i>Petiveria alliacea</i> , da população MG, obtidas a partir da germinação <i>in vitro</i>	54
Figura 9 -	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de ápices caulinares de <i>P. alliacea</i> em presença de diferentes fitorreguladores apos 60 dias de cultura.....	57
Figura 10 -	Desenvolvimento de embriões somáticos a partir de folhas das diferentes populações de <i>P. alliacea</i> mantidas em BOD por 30 dias.....	59
Figura 11 -	Indução de raízes adventícias a partir de explantes radiculares de <i>P. alliacea</i> da população AL em meio MS suplementado com AIB em diferentes concentrações.....	60
Figura 12 -	Indução de rizogênese em explantes radiculares das diferentes amostras de <i>Petiveria alliacea</i> , em meio MS líquido suplementado com IBA 1,02 µM após 90 dias de subculturas.....	62
Figura 13 -	Meio líquido MS suplementado com AIB 1,02 µM provenientes de subculturas de raízes mantidas no escuro, apresentando diferença na coloração do meio dependendo da amostra avaliada.....	63
Figura 14 -	Indução de raízes adventícias e brotos a partir de segmentos radiculares de plantas <i>in vitro</i> da população AL, em meio MS líquido suplementado com IBA 2,04 µM.....	65
Figura 15 -	Embriões somáticos da amostra AL a partir de raízes cultivadas em presença de diferentes fitorreguladores.....	66

Figura 16 -	Morfogênese a partir de segmentos radiculares de <i>Petiveria alliacea</i> cultivados em meio MS líquido suplementado com AIB.....	67
Figura 17 -	Análise histológica de raízes de <i>Petiveria alliacea</i> amostra NT, cultivadas em meio MS líquido suplementado com AIB 27,0 µM, após 120 dias.....	68
Figura 18 -	Embriões somáticos das diferentes amostras de <i>P. alliacea</i> obtidos a partir de raízes em meio suplementados com AIB mantidos em BOD durante duas semanas.....	71
Figura 19 -	Recuperação após criopreservação de embriões somáticos a formados a partir de raízes de <i>P. alliacea</i> com 30 dias.....	73
Figura 20 -	Dendograma de similaridade entre as diferentes populações de <i>P. alliacea</i>	77
Figura 21 -	Padrão de amplificação em quarto amostra de DNA de <i>P. alliacea</i> , a partir de quatro diferentes regiões do RJ, usando diferentes iniciadores.....	78
Figura 22 -	Padrão de amplificação com diferentes iniciadores de clones da amostra de VI produzidas em resposta de BAP....	81
Figura 23 -	Padrão de amplificação da amostra NT multiplicada usando o fitorregulador BAP com diferentes iniciadores.....	82
Figura 24 -	Padrão de amplificação de clones das plantas da população de NT originadas de plantas convertidas a partir de embriões somáticos após criopreservados pela técnica de vitrificação.....	83
Figura 25 -	Padrão de amplificação de plantas a partir de ESFVG e ESFVI obtidos a partir de meio MS suplementado com PIC 20 µM.	84
Figura 26 -	Perfis cromatográficos obtidos por CG-EM em diferentes extratos de folhas de <i>P. alliacea</i> , amostra NT.....	89
Figura 27 -	Perfis cromatográficos obtidos por CG-EM, em diferentes extratos de folhas de <i>P. alliacea</i> , amostra MG.....	90
Figura 28 -	Perfis cromatográficos obtidos por CGEM, em diferentes extratos de folhas de <i>P. alliacea</i> , amostra VI.....	91
Figura 29 -	Cromatografia do padrão do Dibenzil trissulfeto (DTS).....	92
Figura 30 -	Cromatografia em camada delgada (CCD) de extrato etanólico de plantas de campo.....	93

Figura 31 -	Cromatografia em coluna de sílica do extrato etanólico de <i>Petiveria alliacea</i>	95
Figura 32 -	Cromatograma dos polissulfetos em diferentes comprimentos de ondas por CLAE.....	99
Figura 33 -	Cromatograma da população de NT. extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de folhas e raízes de campo.....	100
Figura 34 -	Cromatograma da amostra de MG, extrato extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de folhas e raízes de campo.....	101
Figura 35 -	Cromatograma da amostra de VI, extrato extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de folhas e raízes de campo.....	102
Figura 36 -	Cromatograma da amostra de MH extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de folhas e raízes de campo.....	103
Figura 37 -	Cromatograma da amostra de NT, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) 70%, folha e raiz <i>in vitro</i> .	105
Figura 38 -	Cromatograma da população NT multiplicadas com BAP, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v), folha e raiz <i>in vitro</i>	106
Figura 39 -	Cromatograma da população NT multiplicadas com TDZ, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) folha e raiz <i>in vitro</i>	107
Figura 40 -	Cromatograma da população NT, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de plantas convertidas a partir da criopreservação de embriões somáticos em PVS2 por 30 min.....	108
Figura 41 -	Cromatograma da população NT de embriões somáticos obtidos a partir de folha e de raiz.	109
Figura 42 -	Cromatograma da amostra de MH, extrato de acetato de etila, folha de campo.	111
Figura 43 -	Cromatograma população MG, extrato de acetato de etila, folha de campo.	112
Figura 44 -	Cromatograma da amostra de VI, extrato de acetato de etila, folha de campo.....	113
Figura 45 -	Cromatograma população NT, extrato de acetato de etila folhas de campo.	114
Figura 46 -	Avaliação qualitativa e semi-quantitativa do efeito do extrato aquoso de <i>Petiveria alliacea</i> em DNA plasmidial (pUC 9.1).	117

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Multiplicação de embriões somáticos a partir de folhas das diferentes populações de <i>P. alliacea</i> mantidas em BOD.	59
Gráfico 2 -	Desenvolvimento de raízes nas diferentes amostras de <i>P. alliacea</i> em meio MS0 líquido suplementado com AIB 1,02 μ M em presença de luz.	62
Gráfico 3 -	Indução de rizogênese em explantes radiculares de <i>Petiveria alliacea</i> , cultivados em meio MS suplementado com AIB 1,02 μ M mantidos no escuro.	63
Gráfico 4 -	Indução de raízes adventícias em explantes radiculares das diferentes populações de <i>Petiveria alliacea</i> , em meio MS suplementado com IBA 2,04 μ M com carvão ativado 0,2%, ao longo de 120 dias.	64
Gráfico 5 -	Desenvolvimento de raízes individuais, novelos e embriões somáticos nas diferentes amostras de <i>Petiveria alliacea</i> após 120 e 240 dias de cultura em meio líquido suplementado com diferentes concentrações de AIB em presença de luz.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Origem e registro em herbário das populações de <i>P. alliacea</i> L. de regiões centrais do Rio de Janeiro, Brasil.	37
Quadro 2 - Sequências dos iniciadores selecionados para análises por RAPD em <i>P. alliacea</i>	45
Quadro 3 - Sistemas de solventes utilizados na CCD para eluição dos extratos da população NT de <i>P. alliacea</i>	48
Quadro 4 - Número de bandas obtidas por iniciador utilizado nas ampliações RAPD nas amostras de plantas <i>in vitro</i> de <i>Petiveria alliacea</i> L. derivadas de diferentes populações.	80
Quadro 5 - Determinação das substâncias separadas por CG-EM, a partir de extratos em acetato de etila, de folhas secas de campo e <i>in vitro</i> de <i>Petiveria alliacea</i> , oriundas de quatro populações naturais.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito de diferentes concentrações de BAP, na multiplicação de ápices caulinares de <i>Petiveria alliacea</i> L.	55
Tabela 2 -	Efeito do TDZ em diferentes concentrações, na multiplicação de apices caulinares de <i>Petiveria alliacea</i> L.	56
Tabela 3 -	Desenvolvimento de embriões somáticos a partir de raízes de <i>P. alliacea</i> cultivadas em BOD 30 dias.	71
Tabela 4 -	Recuperação de embríones somáticos da amostra NT criopreservados por vitrificação em PVS2.	74
Tabela 5 -	Número de bandas obtidas por RAPD nas as amostras de populações de campo de <i>P. alliacea</i>	79
Tabela 6 -	Determinação das substâncias volatilizadas e separadas por CG-EM, a partir de extratos etanólicos de folhas frescas (campo e <i>in vitro</i>) de <i>Petiveria alliacea</i> oriundas de três populações naturais.	88
Tabela 7 -	Determinação das substâncias volatilizadas e separadas por CG-EM, extrato de acetato de etila de folhas frescas (campo e <i>in vitro</i>) de <i>Petiveria alliacea</i> oriundas de três populações naturais.	88
Tabela 8 -	Valores de Rf das amostras de <i>Petiveria alliacea</i> L. obtidos por CCD.	93
Tabela 9 -	Identificação de polissulfetos em extratos de diferentes materiais de quatro populações de <i>Petiveria alliacea</i> L. em diferentes comprimentos de onda.	104
Tabela 10 -	Identificação dos diferentes polissulfetos nas diferentes amostras de campo de <i>P. alliacea</i> em extrato de acetato de etila e álcool absoluto em diferentes comprimentos de onda.....	110

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

λ	Lâmbda
2,4D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
AFLP	Polimorfismos de comprimento em fragmentos amplificados
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	Benzilaminopurina
BOD	Estufa de germinação tipo BOD
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia com Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
D.O	Densidade óptica
DDS	Dibenzil Dissulfeto
DMS	Dibenzil Sulfeto
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTS	Dibenzil Trissulfeto
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ESFMG	Embriões somáticos de folha de MG
ESFVI	Embriões somáticos de folha de VI
KCl	Cloreto de potássio
LB	meio de cultura Luria Broth
MATAB	Tampão Alkyltrimethymmoium bromide
MG	Magé
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MH	Marechal Hermes

MS ½	Meio de cultura Murashige & Skoog meia força
MS0	Meio de cultura Murashige & Skoog sem fitoreguladores
NaOCl	Cloreto de sódio
NBV	Núcleo de Biotecnologia Vegetal
ND	Não definido
NL	Nitrogênio líquido
NT	Niterói
PB	pares de base
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PIC	Picloram
pUC	Plasmídeo da Universidade de Califórnia
PVS2	Solução de vitrificação de plantas (<i>Plant vitrification solution</i>)
RAPD	Marcadores polimórficos amplificados aleatoriamente
SERVEN	Serviço de Genética Humana
SnCl ₂	Cloreto estânico
T.R.	Tempo de retenção
TBE	Tampão contendo Tris, Ácido Bórico e EDTA
TDZ	Thidiazuron
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano
TTC	Teste do trifeniltetrazólio
VI	Vila Isabel

Sumário

INTRODUÇÃO

1	<i>Petiveria alliacea</i> L.	21
1.1	Composição Fitoquímica	22
1.2	Efeitos Biológicos	25
1.3	Cultura de tecidos vegetais	26
1.3.1	<u>Produção <i>in vitro</i> de <i>Petiveria alliacea</i></u>	28
1.4	Conservação <i>in vitro</i> de recursos genéticos vegetais	29
1.4.1	<u>Criopreservação</u>	30
1.5	Variação somaclonal	31
1.5.1	<u>Monitoramento da estabilidade genética e metabólica</u>	33
2.	OBJETIVO	35
2.1	Objetivo geral	35
2.2	Objetivos específicos	35
3.	METODOLOGIA	36
3.1	Material vegetal	36
3.1.1	<u>Condições Físicas da Cultura <i>in vitro</i></u>	37
3.2	Germinação <i>in vitro</i>	38
3.3	Micropropagação	38
3.3.1	<u>Multibrotação</u>	38
3.3.2	<u>Indução de embriogênese somática</u>	39
3.3.3	<u>Indução de raízes adventícias</u>	39
3.3.4	<u>Análise estatísticas</u>	41
3.4	Análise histológica	41
3.5	Criopreservação	42
3.6	Monitoramento da estabilidade genética	43
3.6.1	<u>Extração de DNA</u>	43
3.6.2	<u>Quantificação do RAPD</u>	43
3.6.3	<u>RAPD</u>	44
3.7	Análise do Perfil fitoquímico e monitoramento da estabilidade metabólica	46
3.7.1	<u>Preparo dos extratos</u>	46
3.7.2	<u>Análises cromatográficas</u>	46

3.8	Avaliação do potencial genotóxico e anti-genotóxico	50
3.8.1	<u>Extração do DNA plasmidial</u>	50
3.8.2	<u>Tratamentos do plasmídeo com os extratos</u>	50
3.8.3	<u>Eletroforese em gel de agarose</u>	51
4.	RESULTADOS	52
4.1	Micropropagação	52
4.1.1	<u>Multibrotação</u>	54
4.1.2	<u>Indução de embriogênese somática a partir de folhas</u>	58
4.2	Indução de raízes adventícias	60
4.2.1	<u>Embriogênese somática a partir de raízes</u>	65
4.3	Criopreservação	72
4.4	Monitoramento da estabilidade genética	75
4.5	Análise do perfil fitoquímico e monitoramento de polissulfetos	85
4.6	Detecção de efeito genotóxico/antigenotóxico	115
4.6.1	<u>Efeito dos extratos na topologia do plasmídeo</u>	115
5	DISCUSSÃO	118
	CONCLUSÕES	128
	REFERÊNCIAS	131

INTRODUÇÃO

Desde seu surgimento no planeta, a humanidade foi descobrindo as propriedades curativas ou tóxicas das plantas, conforme a sua utilização. Estas informações foram transmitidas através de gerações e diferentes doenças foram sendo tratadas com a utilização de determinadas espécies, que se tornaram um instrumento importante na medicina (ALVES, 2001; SOUZA, 2015). Além disso, as plantas, cujas preparações demonstravam efeitos neurológicos em animais e humanos, eram consideradas mágicas e utilizadas em rituais místicos de muitas religiões. No Brasil, o conhecimento em relação ao uso das plantas, visando preservar a saúde do homem ou para fins ritualísticos, resulta principalmente de uma mistura de tradições transmitidas a partir de comunidades indígenas, africanas e europeias (SOUZA, 2015).

Entretanto, a transmissão destes conhecimentos para as futuras gerações está em risco por várias razões, entre as quais, o avanço da indústria química e fitoquímica, aumentando a produção de medicamentos sintéticos, disponíveis comercialmente, além da exploração predatória de plantas nativas, e a conseqüente diminuição da biodiversidade (GASPAR, 2016; LÈDA, 2016). A partir de 1992, a conservação da biodiversidade vegetal vem sendo tratada como tema de segurança nacional, imprescindível para embasar o desenvolvimento sustentável que pode garantir o futuro das próximas gerações (CDB, 2000).

Diferentes estratégias vêm sendo utilizadas para conservar o germoplasma destas espécies, entre as quais estão as técnicas biotecnológicas de produção vegetal baseadas no cultivo *in vitro*, respaldadas pela Lei de acesso ao patrimônio genético (Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015). Neste contexto, a cultura de tecidos de plantas medicinais, além da produção e conservação, também tem propiciado a identificação, o isolamento e a liberação de muitos fármacos novos no mercado, aumentando as perspectivas de conservação e exploração econômica destas espécies (TRIPATHI; TRIPATHI, 2003; VANISRE et al., 2004; FOGGIO et al., 2006).

1. *Petiveria alliacea* L.

Petiveria alliacea L. (Phytolaccaceae) é uma espécie com propriedades medicinais, que possui uma ampla distribuição geográfica, sendo conhecida por diversos nomes populares que variam conforme a sua localização.

No Amazonas e na Bahia é conhecida como amansa-senhor, mas em todo o Brasil também é conhecida como erva-de-guiné, erva-tipi e murucaá dentre outros (LUZ et al., 2016). No Rio de Janeiro é mais conhecida como erva-de-guiné ou pipi (CAMARGO, 2007). Além do uso medicinal, devido a inúmeras propriedades terapêuticas, também é muito utilizada em rituais religiosos, em banhos e defumadores (CANO; VOLPATO, 2004; CASTELLAR, 2006; LUZ et al., 2016).

A espécie *P. alliacea* possui hábito herbáceo e subarborescente (Figura 1), com forte odor alíáceo, constituindo um gênero monotípico (UDULUTSCH et al., 2007). Entretanto, há controvérsias sobre a ocorrência de variedades ou subespécies (MOBOT, 2010). Em trabalhos iniciados no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV/UERJ), a caracterização de populações ocorrentes no Rio de Janeiro foi consistente com aquela proposta por Udulutsch e colaboradores (2007), que reconheceram duas variedades: *P. alliacea* L. var. *alliacea* e *P. alliacea* var. *tetrandra* (BAGomes) Hauman, com base na morfologia do ovário, embora as diferenças na morfologia foliar e na produção de flavonóides também tenham sido evidenciadas (SOARES, 2010; SOARES et al., 2013).

Figura 1 – *Petiveria alliacea* L.



Legenda: Aspecto geral da planta com inflorescência terminal.
Fonte: SOARES, 2011.

1.1 Composição fitoquímica

Diversos trabalhos já foram publicados sobre a diversidade fitoquímica da espécie *P. alliacea*. Nas raízes encontram-se diversas substâncias já isoladas e identificadas: benzaldeído, dibenzil dissulfeto (DDS), *cis-e trans*-estilbenos, dibenzil trissulfeto (DTS) e cumarina (KUBEC; KIM; MUSAH, 2002; KUBEC; KIM; MUSAH, 2003; DE SOUSA et al., 1990). Nas folhas também já foram identificados flavonoides, além de outras substâncias, como glicosídeos saponínicos, triterpenos, isoarborinol, isoarboriol acetato, isoarborinol cinamato, esteróides, alcaloides e taninos (DE SOUSA et al., 1990; DELLE-MONACHE; SUAREZ, 1992; DELLE-MONACHE; MENICHINI; SUAREZ, 1996).

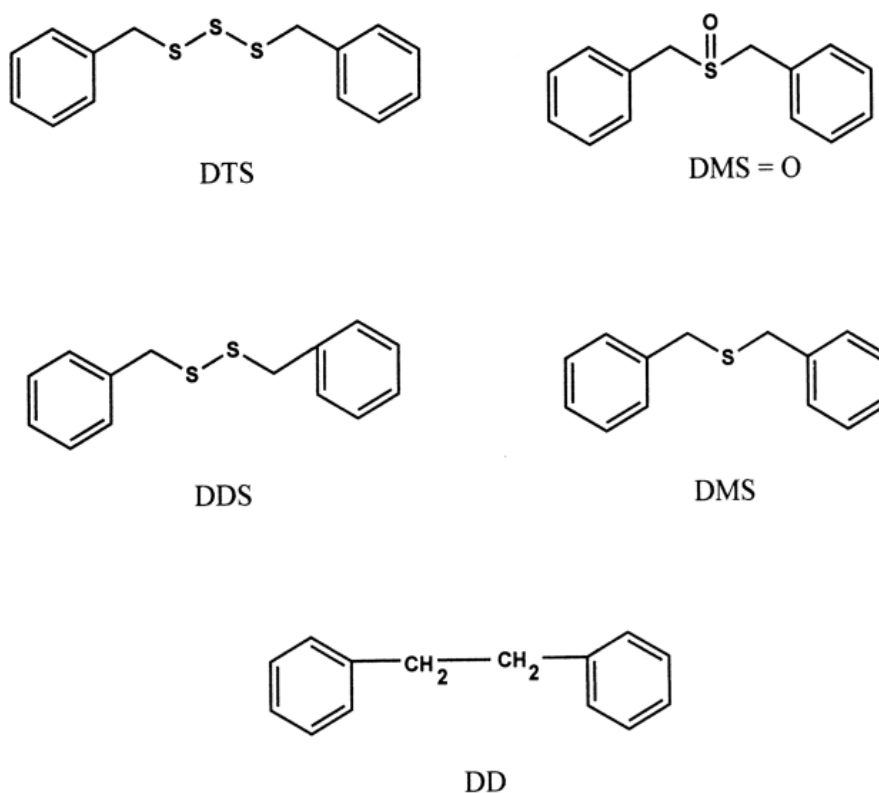
Sendo uma espécie aromática, o forte aroma característico de alho foi utilizado para a denominação da espécie. Destaca-se a presença de organosulfurados, entre os quais estão incluídos vários polissulfetos isolados pela primeira vez de *P. alliacea*, como dibenzil sulfeto (DMS), DDS e DTS, comercializados pela empresa Sigma-Aldrich® (DE SOUSA et al., 1990; KUBEC; KIM; MUSAH, 2002, RAMIEZ, 2003).

A síntese de metabólitos contendo enxofre em *P. alliacea* já foi elucidada, evidenciando-se que são todos produtos do metabolismo da cisteína. O mecanismo de síntese é semelhante àquele observado na via biossintética de aliína (KUBEC; MUSAH, 2001), também um produto derivado da cisteína, presente em espécies da família Liliaceae (*Allium sativum* L., *Allium cepa* L. e *Allium porrum* L) e outras espécies afins (KUBEC; MUSAH, 2001). Nesta via, a aliína, assim como os sulfóxidos de cisteína em *P. alliacea*, se constituem de substâncias sulfurosas armazenadas nos tubérculos e raízes, sendo que seus produtos de degradação não estão presentes nos tecidos intactos (KUBEC; MUSAH, 2001). As substâncias derivadas desses sulfóxidos (por ex., polissulfetos, benzaldeídos, tritilaniacina, estilbenos, benzil mercaptano, ácido benzóico), apresentam uma gama de atividades biológicas.

Polissulfetos presentes em *P. alliacea* são produzidos após a hidrólise dos precursores, pela ação de enzimas específicas (alliinase ou C-S liase), compartimentalizadas em locais separados. Quando ocorre dano tecidual e lise celular, as enzimas são liberadas convertendo os precursores (sulfóxidos de

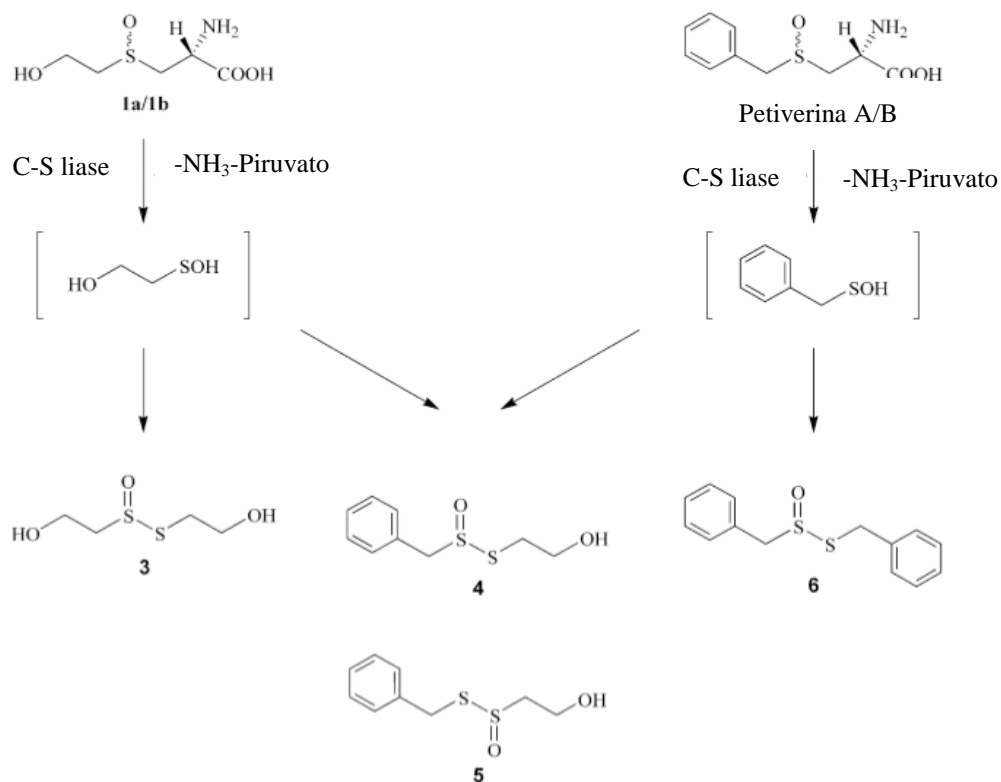
cisteína), estocados nos vacúolos, em alicina ou petiverina, dependendo da espécie, que se classificam como tiosulfinaos, produtos quimicamente instáveis que originam polissulfetos durante sua decomposição (SIMÕES et al., 2007). Em *P. alliacea*, a petiverina pode se apresentar sob duas formas isoméricas (Figura 2) (KUBEC; KIM; MUSAH, 2002), que originam o DTS e outras substâncias relacionadas (Figura 3) (ROSNER et al., 2001).

Figura 2 – Fórmula estrutural de tiosulfinaos em *Petiveria alliacea*.



Fonte: ROSNER et al., 2001.

Figura 3 – Formação enzimática de polissulfetos de *P. alliacea*.



Legenda: **3**: S-(2-hydroxyethyl) 2-(hydroxyethane)thiosulfinate; **4**: S-(2-hydroxyethyl)phenylmethanethiosulfinate; **5**: S-benzyl 2-(hydroxyethane)thiosulfinate; **6**: S-benzyl phenylmethanethiosulfinate (petivericin).

Fonte: KUBEC; KIM; MUSAH, 2002.

1.2 Efeitos Biológicos

A literatura científica é abundante em trabalhos sobre os efeitos biológicos de *P. alliacea*, o que vêm despertando grande interesse devido às substâncias bioativas presentes nos extratos da espécie. Efeitos neurológicos já eram bem conhecidos no período colonial do Brasil e há relatos da utilização ritualística em cultos afro-brasileiros até o presente (LEMUS et al., 2004). Além disso, foram identificados inúmeros efeitos benéficos para uso terapêutico e profilático, destacando-se os efeitos analgésico e anti-inflamatório (DE LIMA; MORATO; TAKAHASHI, 1991). Entretanto, devido à grande diversidade química, efeitos citotóxicos também têm sido descritos, principalmente contra células neoplásicas, o que tem gerado grande interesse da indústria farmacêutica por esta espécie, visando à produção de medicamentos quimioterápicos (AN et al., 2006). A atividade citotóxica está associada ao mecanismo de ação do DTS e de seus derivados, que desencadeiam a transdução de sinal e alteração da expressão gênica, mostrando-se potentes inibidores de uma vasta gama de linhagens de células cancerosas, impedindo sua proliferação (WILLIAMS et al., 2007). Foi verificado que este efeito deve-se a uma proteína quinase ativada por mitógenos extracelulares que desencadeia a transdução de sinal e a alteração da expressão gênica (WILLIAMS et al., 2007).

Recentemente, Urueña et al. (2008) confirmaram que os polissulfetos e flavonoides presentes em *P. alliacea* aumentaram a atividade das enzimas responsáveis pela indução de apoptose nas linhagens celulares testadas, paralisando o ciclo celular na fase G2 e induzindo alteração acentuada da morfologia celular. Do mesmo modo, demonstrou-se que as diferentes frações analisadas empregaram diferentes mecanismos para deter o ciclo celular. Enquanto algumas frações induziram apoptose por despolarização da membrana mitocondrial, outras estimularam a ativação de endonucleases. Atualmente, o DTS é um produto natural de grande interesse na luta contra o câncer. Entretanto, sua disponibilidade é limitada a partir de fontes naturais (CUERVO, 2011). O isolamento desta substância já permitiu sua síntese artificial (AN et al., 2006), e modificações químicas, que geraram novas moléculas com atividade citotóxica muito superior ao próprio DTS (BAO et al., 2008; AN et al., 2006).

Além dos efeitos citotóxicos descritos, os extratos da espécie também têm demonstrado um potencial genotóxico, Hoyos e colaboradores (1992) relataram uma atividade genotóxica moderada, com base em alterações citogenéticas, utilizando ouriços-do-mar como modelo. O efeito em DNA plasmidial foi determinado em estudos preliminares no NBV, que demonstraram que variou em função da origem da planta (SOARES, 2011). Por outro lado, a presença de flavonoides nos extratos tem sido correlacionada aos efeitos antioxidantes, retardando ou inibindo a oxidação de lipídios ou de outras moléculas (OKADA et al., 2008; SIMÕES et al., 2007). Uma atividade antioxidante bem definida já foi descrita para alguns componentes dos extratos de *P. alliacea* (OKADA et al., 2008).

O extrato bruto dessa espécie foi incluído no Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (CEME) do ministério da saúde para a realização de ensaios clínicos, objetivando avaliar o efeito analgésico e anti-inflamatório do chá em portadores de osteoartrose, os quais apresentaram melhora significativa dos sintomas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Entretanto, apesar de comercializados livremente nos EUA e em outros países, nenhum medicamento fitoterápico produzido a partir dos extratos ou partes da planta de *P. alliacea* foi liberado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil (CASTELLAR, 2006; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.3 Cultura de tecidos vegetais

Novas técnicas biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas, permitindo aprofundarem-se os estudos ao nível celular e molecular em plantas (SOUZA; JUNGHANS, 2006). A cultura de tecidos vegetais foi e continua sendo a base para o desenvolvimento da biotecnologia vegetal, sendo definida por um conjunto de técnicas que utilizam pequenos fragmentos isolados da planta (explantes) inoculados assepticamente em meio nutritivo, incubados por determinado período de tempo, sob condições controladas de luminosidade e temperatura. Ao final do período de cultura, novos brotos, órgãos ou embriões são gerados a partir do tecido do explante, através de propagação vegetativa, originando clones da planta doadora dos explantes, em processo denominado

micropropagação, que possibilita altas taxas de multiplicação (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

A capacidade de se obterem plantas em meio artificial se baseia na totipotência. Esta característica permite que as células vegetais se diferenciem por vias diferentes, sob estímulos apropriados (GEORGE et al., 2008). Teoricamente, todas as células vegetais seriam capazes de expressar sua totipotência, no entanto, como os explantes são uma mistura de estados fisiológicos, bioquímicos ou de desenvolvimento variados, a exposição desses explantes a um ambiente *in vitro* estimula reações diversificadas que pode induzir respostas regenerativas apenas em algumas células do explante (MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994). A habilidade que uma célula ou um grupo de células tem de responder a um estímulo indutivo, visando à um processo de desenvolvimento, é denominada de competência celular (GEORGE, 2008; NETO; ANDRADE, 2011).

Dentre as vias regenerativas que podem ser estabelecidas após a indução, no ambiente da cultura, observa-se a formação de brotos e/ou raízes por organogênese ou a formação de embriões por embriogênese somática, processos que podem ocorrer diretamente, a partir do tecido do explante, ou indiretamente, quando há formação de calo intermediário, que se caracteriza por um grupo, ou massa de células com crescimento desordenado, que pode apresentar certo grau de diferenciação (SOUZA; JUNGHANS, 2006; GEORGE, 2008).

Foram também estabelecidas culturas desdiferenciadas, como calogênese e cultura de células em suspensão (CASTELLAR; GAGLIARDI; MANSUR, 2011).

A obtenção e multiplicação de plantas *in vitro* por micropropagação têm permitindo a produção de várias espécies, com diferentes finalidades e aplicações. Além da produção de plantas completas ou brotos, culturas de órgãos ou embriões somáticos têm se mostrado sistemas úteis para a produção específica de metabólitos especiais em muitas espécies, independentemente de fatores ambientais.(GLOBO-NETO; LOPES, 2007).

1.3.1 Produção *in vitro* de *Petiveria alliacea*

Estudos biotecnológicos com *P. alliacea* L. foram iniciados no NBV, sendo esta espécie propagada *in vitro*, pela primeira vez, por meio da cultura de segmentos nodais, originando apenas uma planta por explante (CASTELLAR, 2006; CASTELLAR; GAGLIARDI; MANSUR, 2011). Além disso, diferentes variedades foram caracterizadas para utilização como matrizes (SOARES et al., 2013), e a multiplicação clonal foi estabelecida através da multibrotação (SOARES, 2011; PIMENTA, 2015) e da embriogênese somática (CANTELMO et al., 2013). Foram também estabelecidas culturas desdiferenciadas, como calogênese e cultura de células em suspensão (CASTELLAR; GAGLIARDI; MANSUR, 2011).

Embora a constituição química da espécie já tenha sido muito estudada, ainda não se conhece o perfil fitoquímico dos materiais produzidos biotecnologicamente. Em trabalho anterior, os componentes voláteis e óleos essenciais mostraram diferenças qualitativas e quantitativas entre as estruturas vegetais, como folhas e inflorescências, de plantas *in vitro* e *ex vitro* (CASTELLAR, 2006; CASTELLAR; GAGLIARDI; MANSUR, 2011). Dentre os processos de cultura de tecidos e órgãos, a produção de raízes *in vitro* ainda não foi descrita, sendo uma das propostas deste trabalho, uma vez que estudos anteriores identificaram a maior produção do DTS nas raízes das plantas desta espécie (DE SOUSA et al., 1990; KUBEC; KIM; MUSAH, 2003).

A comparação do perfil fitoquímico e dos efeitos biológicos através de modelos otimizados mostram-se muito úteis para a validação de sistemas de produção *in vitro* de espécies medicinais. Além disso, a produção de metabólitos secundários em culturas de tecidos vegetais tem sido relatada, em várias espécies, como resultado da manipulação das condições de cultura (BOURGAUD et al., 2001; TRIPATHI; TRIPATHI, 2003; VANISRE et al., 2004; CUERVO, 2011). Dessa forma, há muitos registros de linhagens com maior potencial produtivo, selecionadas pela adição de inibidores ou precursores ao meio, visando a elicitação (MARASCHIM; VERPOORTE, 1999; ALVES, 2001; VANISRE et al., 2004).

1.4 Conservação *in vitro* de recursos genéticos vegetais

A conservação *in vitro* é uma estratégia fundamental para garantir a disponibilidade dos genes de interesse visando ao desenvolvimento sustentável. A necessidade de conservação se aplica aos diferentes componentes da biodiversidade, incluindo amostras de espécimes vegetais a partir de condições *in situ*, domesticadas ou mantidas em coleções *ex situ* e/ou sob a forma de moléculas ou substâncias provenientes do metabolismo, além de extratos brutos obtidos destes organismos vivos ou mortos, incorporados ao patrimônio genético (CDB, 2000). Neste contexto, a conservação dos materiais produzidos biotecnologicamente a partir de espécies medicinais deve ser estabelecida, visando à disponibilidade dos sistemas de produção de metabólitos de interesse para a pesquisa farmacológica.

Embora o germoplasma vegetal possa ser conservado tanto no ambiente de ocorrência natural (*in situ*), quanto fora deste ambiente (*ex situ*), a conservação dos materiais biotecnológicos é unicamente realizada *ex situ*, podendo ser estabelecida a campo, ou *in vitro* através da cultura de tecidos ou da criopreservação (ENGELMANN, 1991; ROUT, et al., 2006; TRIPATHI;TRIPATHI, 2003).

A conservação através da cultura de tecidos geralmente é realizada por crescimento lento, que requer o uso de agentes retardantes do crescimento, uma vez que o objetivo não é a multiplicação rápida e sim a manutenção dos tecidos para uso futuro. Os retardantes mais utilizados podem ser hormonais ou osmóticos, mas em ambos os casos, em função da concentração e do tempo de exposição, representam fatores de estresse potencialmente causadores de instabilidade genética, culminando com o aparecimento de variantes fenotipicamente observáveis ou não (REED; GUPTA; UCHENDU, 2013). A manutenção de plantas em cultura também pode ser realizada sob crescimento ativo, estratégia que, apesar de mais laboriosa, é mais adequada a projetos de conservação de curto ou médio prazos (0 a 6 anos), pois os fatores de estresse podem ser minimizados durante a padronização da cultura (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2014). Embora a cultura de tecidos venha sendo utilizada para fins de conservação *in vitro*, os fatores inerentes ao ambiente artificial de cultivo, incluindo luz, meios de cultivo, umidade e tempo de cultivo *in vitro*, podem levar a alterações genéticas no material (MUJIB; BANERJEE; GOSH, 2013).

1.4.1 Criopreservação

Dentre as técnicas disponíveis para conservação *in vitro* de materiais vegetais, a criopreservação é a técnica mais adequada para conservar germoplasma vegetal por longos períodos, em nitrogênio líquido (-196 °C) ou na sua fase de vapor (-150 °C). Os tecidos armazenados podem se constituir de sementes, ápices caulinares, embriões zigóticos ou somáticos, pólen etc. Este método tem sido muito usado para a conservação de vegetais com sementes recalcitrantes, ou aqueles que não produzem sementes (ENGELMANN, 1991; ENGELMANN, 1997; PANIS; LAMBARDI, 2005).

A temperatura ultra baixa utilizada na criopreservação interrompe o metabolismo vegetal, bloqueando a divisão celular e as reações bioquímicas. Desta forma o armazenamento é mais seguro, não ocorrendo mudanças ou deterioração ao longo do tempo. Portanto a criopreservação é o método mais adequado para o armazenamento de plantas com características especiais, como plantas medicinais, células produtoras de substâncias de interesse, raízes em cabeleira, e plantas geneticamente transformadas (SAKAI; ENGELMANN, 2007; PANIS; LOMBARDI, 2005).

Entretanto, a utilização de temperatura ultra baixa pode induzir a formação de cristais de gelo, que causam injúrias ou até mesmo a morte dos tecidos (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2014; CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013). A cristalização em baixa temperatura ocorre devido à polaridade da molécula de água, presente nos compartimentos intra e extra-celular (ENGELMANN, 2011). Por esta razão, as técnicas disponíveis para a criopreservação incluem etapas de crioproteção, através da desidratação, para a retirada de toda a água não estrutural, e/ou da vitrificação em presença de soluções específicas que, após absorvidas, formam um sólido amorfo (vítreo), sob temperaturas ultra-baixas. A vitrificação dos embriões somáticos já foi aplicada em *P. alliacea* (PETINELLI, 2013), a fim de preservar estruturas celulares, comprovadamente produtoras de polissulfetos (WEBSTER, et al., 2008).

Apesar da criopreservação ser considerada a técnica que permite o armazenamento mais estável geneticamente (KAVIANI, 2011), os tratamentos visando à desidratação e crioproteção podem causar estresses capazes de induzir variação

genética. Além disso, as condições de recuperação envolvem as mesmas etapas discutidas acima, pelas quais passam as plantas mantidas em cultura. Desta forma, a conservação de germoplasma através de criopreservação também requer monitoramento, tanto genético quanto biossintético (KAVIANI, 2011).

1.5 Variação Somaclonal

O advento das técnicas de cultura de tecidos vegetais trouxe grandes expectativas em relação à propagação clonal. Entretanto, desde o início da utilização dessas técnicas observou-se grande número de variantes fenotípicas, cujas características eram transmitidas através das subculturas. Estas variações podem ser influenciadas por fatores anteriores ao cultivo *in vitro* ou induzidas exclusivamente pelas condições de cultura (KAEPLER; PHILIPS, 1993; JOYCE; CASSELLS, 2002). Essas variantes apareciam, sobretudo, em plantas regeneradas através de organogênese indireta ou de culturas de células em suspensão e foram definidas como variações somaclonais (AYDIN, et al., 2015; ASHWINI, et al., 2015; LARKIN; SCOWCROFT, 1981)

Além da via de regeneração, vários outros fatores podem influenciar a taxa de variação somaclonal, tais como genótipo, tipo e concentração de reguladores de crescimento e outras condições padronizadas na cultura, como temperatura, umidade, salinidade e outras (AYDIN, et al., 2015; LANDEY et al., 2015; KARP et al., 1997; PARDO et al., 2015). Portanto, todo o material vegetal produzido e/ou conservado biotecnologicamente, através da cultura *in vitro* ou criopreservação, está vulnerável aos estresses inerentes a estas condições, os quais podem causar alterações no DNA (SEBASTIANI; FICCADENTI, 2016). As variações somaclonais têm sido bastante utilizadas no melhoramento vegetal (WINARTO et al., 2011). Entretanto, a instabilidade genética constitui um sério problema na produção clonal, na conservação de germoplasma ou na produção de metabólitos (ENGELMANN, 1997; MARTIN et al., 2001). A natureza das variações vêm sendo estudada desde então, sendo atualmente classificadas em genéticas ou epigenéticas (AYDIN, et al., 2015; JOYCE; CASSELLS, 2002; SAZE, 2008; SEBASTIANI; FICCADENTI, 2016; WINARTO et al., 2011).

A base genética da variação somaclonal envolve uma série de alterações, incluindo mutações pontuais, ampliações, inserções e deleções de sequências de DNA ou modificações maiores, como número e estrutura de cromossomos, podendo ocorrer tanto ao nível do genoma nuclear quanto do mitocondrial ou cloroplastídico (KARP; BRIGHT, 1985; LANDEY, et al., 2015). A presença de loci “hipervariáveis”, com altas taxas de mutações promovidas pelas condições de cultura *in vitro* tem sido descritas em várias espécies (LINACERO; ALVES; VÁZQUEZ, 2000). De fato, observa-se que, apesar das taxas de mutação mais elevadas nas culturas, os alelos formados são naturalmente encontrados nas populações de campo, indicando que os mecanismos representados por estresses ambientais que promovem a variabilidade são semelhantes aos que induzem a variabilidade *in vitro*, de forma mais concentrada (LINACERO; ALVES; VÁZQUEZ, 2000).

Além das alterações de caráter genético, podem ser exemplificadas por variações fenotípicas sem relação com a seqüência do DNA, mas que podem ser ou não herdadas de uma geração para a próxima. Vários mecanismos estão envolvidos na herança epigenética, como a metilação do DNA, modificações das histonas, paramutação, arranjo de nucleossomos, e outros (LANDEY, et al., 2015; BIRD, 2007; CHEN; LV; MENG, 2010). No entanto, a base das alterações epigenéticas ainda não está clara entre os pesquisadores.

Dentre os muitos exemplos de variações de causas epigenéticas, destaca-se o potencial biossintético de metabólitos especiais cuja expressão espontânea é bastante variável, mesmo dentro de linhagens selecionadas. A hipótese mais usada para explicar essa heterogeneidade é baseada na ocorrência de mutações e seleção natural embora outros mecanismos também possam estar presentes em populações com distribuição restrita. Nas condições artificiais da cultura há evidências que indicam que mudanças no padrão de metilação podem alterar as vias de expressão gênica durante o desenvolvimento. Alguns autores sugerem que essas alterações nos padrões de metilação do DNA provocadas pelas condições de estresse inerentes à cultura constituiriam a base molecular da variação somaclonal, afetando a expressão de genes específicos, ativando elementos móveis ou a estrutura da cromatina (CHEN; LV; MENG, 2010; LANDEY et al., 2015).

1.5.1 Monitoramento da estabilidade genética e metabólica

Apesar das evidências de que vários fatores contribuem para a ocorrência de instabilidade genética e epigenética em culturas *in vitro*, não é possível ainda prever o aparecimento da variação somaclonal, principalmente porque não se sabe como estes fatores interagem e qual a importância relativa de cada um. Desta forma, condições idênticas podem levar a resultados diferentes, tornando-se fundamental a utilização de sistemas para o monitoramento dessas variações (KARP et al., 1997). O monitoramento da estabilidade genética deve ser realizado através de diferentes abordagens como a comparação de características morfológicas, bioquímicas, citogenéticas e moleculares (WINARTO et al., 2011; SISUNANDAR et al., 2010).

A avaliação fenotípica tem sido muito utilizada porque constitui-se da estratégia mais simples para monitorar a estabilidade genética, através da avaliação qualitativa e/ou quantitativa de descritores morfológicos pré-definidos para a espécie em estudo (WINARTO et al., 2011). Essas variações são herdáveis e, normalmente irreversíveis. Apesar de não permitirem a avaliação de características recessivas, os descritores constituem-se de marcadores valiosos na caracterização do germoplasma e têm sido muito usados em conjunto com estratégias moleculares e bioquímicas (HAO; LIU; DENG, 2001; KUMAR; BARKER; REED, 1999; VICENTE; METZ; ALERCIA, 2004).

Embora vários marcadores possam ser usados para a análise molecular, a escolha da técnica vai depender de vários fatores, relacionados com o objetivo do trabalho. Neste contexto tanto o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) quanto o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) são métodos mais utilizados para detectar a ocorrência de variação somaclonal após procedimentos de micropropagação ou conservação *in vitro* (GAGLIARDI et al., 2007; HOSSAIN et al., 2003; PACHECO et al., 2008a; POOJA; JAISWAL; JAISWAL, 2011).

Ambas as técnicas são baseadas na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). O RAPD é um dos métodos que detecta polimorfismo com base na amplificação do DNA utilizando iniciadores aleatórios de sequência de nucleotídeos arbitrários. Pequena quantidade de DNA é utilizada, pois a técnica é simples, rápida e barata em comparação com outros marcadores (SEMAGM; STEDJE; BJORNSTAD, 2001).

Uma vez que a variação gerada pela cultura constitui um fator restritivo para a aplicação de metodologias *in vitro* em programas que requerem uniformidade genética, os sistemas de cultura utilizados para a conservação e recuperação de materiais submetidos à criopreservação, devem ser acompanhados por metodologias de monitoramento da estabilidade do material. Por esta razão, as plantas e outras estruturas obtidas ou recuperadas através do cultivo *in vitro*, serão, neste trabalho avaliadas através de RAPD.

Com relação ao metabolismo secundário, a variabilidade observada na produção de substâncias em culturas de células e tecidos vegetais tem sido contornada pela identificação de clones com maior produtividade, e monitoramento da biossíntese, visando à manutenção das culturas com esta finalidade (MARASCHIM; VERPOORTE, 1999). Portanto, neste trabalho, além do monitoramento molecular, os perfis fitoquímicos, a biossíntese de polissulfetos e os efeitos biológicos ao nível do DNA serão comparados visando uma análise abrangente das perspectivas de utilização de plantas de *P.alliacea* produzidas em cultura de tecidos vegetais.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Esse trabalho visa ao estabelecimento do cultivo e conservação *in vitro* de *P. alliacea* L. além do estabelecimento de metodologias de monitoramento da variabilidade genética decorrente de morfogênese e criopreservação, por meio de marcadores moleculares, bioquímicos e efeitos metabólicos.

2.2 Objetivos específicos

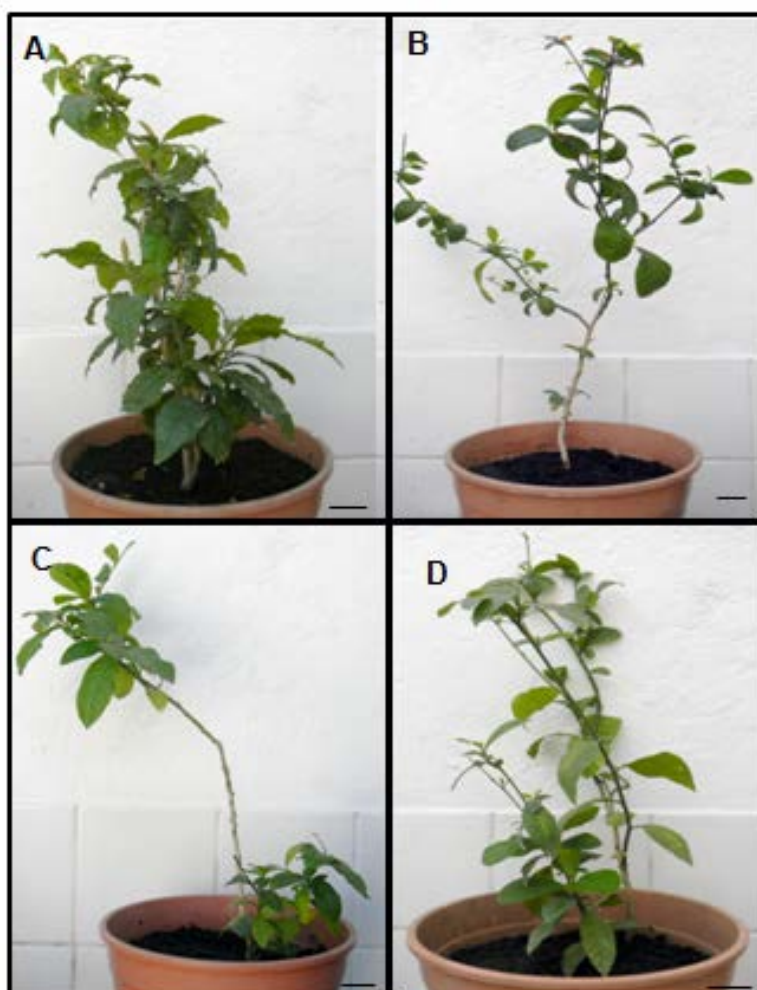
- ✓ Estabelecer culturas de raízes e otimizar cultura de brotos obtidos a partir de amostras de *P. alliacea* de diferentes populações;
- ✓ Criopreservar embriões somáticos obtidos a partir das amostras estudadas;
- ✓ Identificar marcadores moleculares que possam ser utilizados como indicadores de variação genética em *P.alliacea* L.;
- ✓ Avaliar o perfil fitoquímico comparativo entre plantas de campo e plantas produzidas *in vitro* por diferentes vias de regeneração;
- ✓ Monitorar a presença de polissulfetos em diferentes estruturas vegetais produzidas *in vitro* , utilizando-se marcadores comerciais como padrões;
- ✓ Determinar o potencial genotóxico e antígenotóxico de diferentes extratos das amostras estudadas, visando o monitoramento do material obtido *in vitro*;

3 METODOLOGIA

3.1 Material vegetal

Amostras de plantas previamente caracterizadas oriundas de diferentes regiões do Estado Rio de Janeiro e mantidas no telado do NBV/UERJ (Figura 4A, B, C, D), foram utilizadas como doadoras de sementes para obtenção de matrizes para a cultura *in vitro* (SOARES, 2010). As plantas, de ocorrência espontânea, foram obtidas por doação, a partir de propriedades particulares (Quadro 1).

Figura 4 – Plantas de campo de *Petiveria alliacea* L. mantidas no telado do NBV/UERJ oriundas de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro - 2013



Legenda: A – Magé (MG), B – Niterói (NT), C – Marechal Hermes (MH) e D – Vila Isabel (VI).

Barra = 1 cm

Fonte: SOARES et al., 2013

Quadro 1- Origem e registro em herbário das populações de *P. alliacea* L. de regiões centrais do Rio de Janeiro, Brasil – 2013

Região RJ	Código da amostra	Georreferenciamento	Registro HRJ*
Magé	MG	22°64'32.18"S e 43°12'22.26"O ele 13 m	11.131
Marechal Hermes	MH	22°51'24.46"S e 43°22'13.75"O ele 17 m	11.711
Niterói	NT	22°53'55".95"S e 43°05'09.37"O elev 54 m	11.710
Vila Isabel	VI	22°54'57.57"S e 43°14'18.54"O elev 22m	11.618
Santa Teresa	AL	22°55'55.27"S e 43°11'49.90"O, elev 167m	10.371

Nota:* Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Fonte: Adaptado de Soares et al., 2013

3.1.1 Condições Físicas da Cultura *in vitro*

O material originado do cultivo *in vitro* foi obtido após diferentes tratamentos com fitorreguladores e incubação em câmara de crescimento, à temperatura de 30°C±2°C, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa média de 46 $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria, com avaliações realizadas mensalmente.

3.2 Germinação *in vitro*

Sementes das diferentes populações foram utilizadas para o estabelecimento das culturas primárias *in vitro*. A descontaminação foi realizada segundo protocolo definido anteriormente (SOARES, 2011) com pequenas modificações nos tempos de exposição ao hipoclorito de sódio (NaOCl). Assim, as sementes foram lavadas três vezes com detergente em água corrente, depois foram imersas em etanol 70%, por 5 minutos, em seguida em solução de NaOCl 1%, por 5 minutos. Além disso, foi realizado um tratamento com Benlate[®] 1% e Agrimicina[®] 1%, durante 15 minutos e só então, as sementes foram inoculadas em meio MS sem reguladores de crescimento (MS0) (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 3% de sacarose, ágar 7g/L com pH a 5,8 suplementado com Benlate[®] 0,04g/l e Agrimicina[®] 300 mg/l. As culturas foram incubadas por uma semana nas condições descritas anteriormente. Após este período, o material livre de contaminação foi transferido para meio MS com metade de seus nutrientes (MS ½) e suplementado com ácido indolacético (AIA) a 0,6 µM (CASTELLAR, 2006), sendo as culturas incubadas nas mesmas condições descritas.

3.3 Micropropagação

3.3.1 Multibrotação a partir de ápices caulinares

Ápices caulinares excisados das plantas obtidas por germinação de sementes *in vitro* foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (4,44 – 13,32 – 22,19 µM), ácido naftalenoacético (ANA) (0,54 – 1,61 – 2,69 µM) e tidiazuron (TDZ) (0,45 – 1,36 – 2,27 µM). Estes experimentos foram realizados com amostras de 10 explantes, de todas as populações estudadas, e repetido até a formação de um estoque de clones de cada população para utilização nos demais experimentos. O material foi inoculado em frascos de cultura (11, 5 cm altura x 5,5 cm largura) contendo 30 mL de meio MS contendo os diferentes fitorreguladores.

3.3.2 Indução de embriogênese somática em folhas

Folhas de plantas *in vitro* das diferentes populações foram utilizadas como explantes para indução de embriões somáticos, seguindo protocolo anteriormente estabelecido (CANTELMO et al., 2013). Segmentos de folhas com 1.0 cm² foram inoculados em meio MS suplementado com Picloram (PIC) 20.0 µM. O pH do meio MS foi ajustado para 5.8 antes da esterilização, em autoclave (15 minutos a 121°C a 1 atm). Os segmentos foliares foram inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio. Essas culturas foram incubadas nas condições descritas anteriormente. Subculturas mensais em meios MS ½, suplementado com AIA para manutenção por 180 dias (CASTELLAR, 2006).

3.3.3 Indução de embriogênese somática de raízes

3.3.3 Indução de raízes adventícias

Para indução de rizogênese, foram utilizados três segmentos de raízes, com 1,0 cm cada (15 mg de raiz), inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo 50 ml de meio MS líquido suplementado com diferentes fitorreguladores em diferentes concentrações: AIA (1,42 – 2,85 – 5,7 – 17,1 – 28,5 µM), ácido naftalenacético (ANA) (1,35 - 2,7 - 5,4 - 16,2 - 27,0 µM), ácido indolil-3-butírico (AIB) (1,02 – 2,04 – 4,08 – 12,24 – 20,4 µM) e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) (1,12 – 2,24 – 4,48 – 13,44 – 22,4 µM). As culturas foram mantidas sob agitação a 110 rpm e incubadas nas condições descritas acima. Subculturas mensais em meios com a mesma composição foram realizadas e avaliadas por 180 dias.

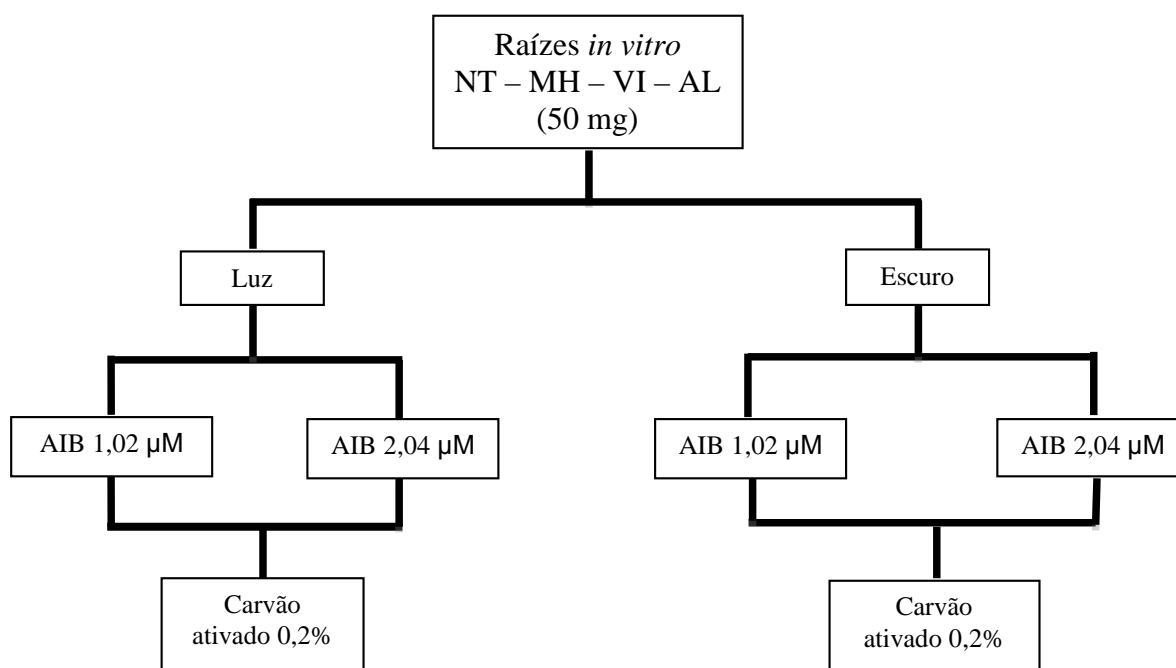
Experimentos preliminares foram realizados com a população AL sendo os explantes radiculares excisados de plantas mantidas na cultura *in vitro* por mais de 8 anos. Em seguida o protocolo foi aplicado às amostras NT, VI, MH e MG e a amostra AL foi usada como controle.

Na sequência, o efeito da concentração de AIB foi avaliado em conjunto com carvão ativado, em presença ou ausência de iluminação, por 90 dias. Para estes

experimentos, foram utilizadas duas concentrações de AIB (1,02 μM e 2,04 μM) (Figura 5) visando garantir a disponibilidade do fitorregulador em presença do carvão ativado (SOUZA; PEREIRA, 2007). Foram utilizados 50 mg raízes de plantas *in vitro* das amostras.

As culturas submetidas aos diferentes tratamentos foram mantidas nas condições de crescimento (item 3.2). A cultura submetida ao tratamento no escuro foi mantida na mesma temperatura. As subculturas foram mensalmente avaliadas quanto aos efeitos causados pelos fatores testados, sendo então transferidas para meio com a mesma composição, e avaliadas durante 120 dias.

Figura 5 - Avaliação da produção de raízes *in vitro* em *P. alliacea*



3.3.4 Análise estatística

Os resultados da cultura de tecidos vegetais foram avaliados após três experimentos, utilizando-se grupos de dez explantes. A frequência de regeneração e o número médio de brotos/embriões por explante foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Turkey-Kramer, com o auxílio do programa Graphpad InStat, considerando-se significativos os valores com $p \leq 0,05$.

3.4 **Análise histológica de embriões somáticos**

A formação de embriões somáticos foi estudada através de análise histológica utilizando microscopia ótica. O material (embriões somáticos obtidos das raízes) foi fixado em solução de glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído 4%, em tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), e armazenado a 4°C. A seguir foi desidratado em etanol, e submetido à inclusão em resina glicol-metacrilato (FEDER; O'BRIEN, 1968) ou parafina, sendo então seccionado em micrótomo rotativo, a uma espessura média de 5 μ m. Para a análise de microscopia em campo claro, as seções histológicas foram coradas com azul de toluidina (JOHANSEN, 1940), sendo as lâminas permanentes montadas em entellan. As análises por microscopia foram realizadas em microscópio Olympus BX41-BF-I-20, e as imagens, obtidas com câmera de vídeo Q Collor R3 e software Image-Pro Express 6.0.

3.5 **Criopreservação de embriões somáticos**

Embriões somáticos em estágios recentes de desenvolvimento e oriundos das diferentes populações estudadas, foram criopreservados por meio de vitrificação, segundo Pettinelli (2013). Os embriões selecionados foram pré-cultivados em meio (MS com metade dos nutrientes) e suplementado com 0,5M de sacarose por 24 horas (PETINELLI et al., 2013). Em seguida, os embriões foram distribuídos em

criotubos e tratados com PVS2 (sacarose a 0,4M, glicerol a 30%, etileno glicol a 15% e DMSO a 15%) (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) por diferentes períodos de tempo (0, 15 e 30 minutos). Posteriormente, a solução crioprotetora foi removida e substituída por 1 mL da mesma solução fresca, antes da imersão em nitrogênio líquido (NL). Após 24 horas, os criotubos contendo os embriões somáticos foram retirados do NL e reaquecidos rapidamente em banho-maria a 40°C, por um minuto. Em seguida, a solução crioprotetora foi substituída por meio MS ½ e suplementado com sacarose a 1,2M por 5 minutos, sendo este meio diluído gradativamente com meio MS ½ líquido, até a concentração de sacarose atingir o valor do MS padrão (3%).

Em seguida, as culturas foram mantidas no escuro e os embriões somáticos foram transferidos para meio MS ½, suplementado com fitagel 0,2%, sob temperatura de 28°C±2°C, até o início da recuperação, definida por qualquer sinal de desenvolvimento, sendo posteriormente mantidos na luz sob a mesma temperatura.

Logo após a retirada do NL e as culturas que não apresentaram sinal de recuperação após 30 dias, foram submetidas ao Teste do trifeniltetrazólio (TTC) (MIKULA; NIEDZIELSKI; RYBCZYJFC, 2006) para determinação da taxa de sobrevivência.

Para a determinação da taxa de sobrevivência à criopreservação, embriões somáticos foram submetidos ao teste TTC imediatamente após a retirada do NL, ou após 30 dias de cultura em meio de recuperação. Os embriões foram mantidos em 1 ml da solução de TTC 28°C, por 24h. Após este período, a porcentagem de sobrevivência foi avaliada visualmente pelo aparecimento de coloração avermelhada nos embriões, considerando-se vivos aqueles totalmente pigmentados em vermelho. Foram avaliados 10 embriões por tratamento.

3.6 Monitoramento da estabilidade genética

3.6.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de folhas frescas e íntegras dos materiais de campo (diferentes populações) e dos materiais *in vitro* plantas obtidas por germinação das diferentes populações, plantas multiplicadas em meio contendo (BAP ou TDZ) da população NT e plantas convertidas de embriões somáticos obtidos a partir de folhas e raízes) seguindo o protocolo descrito por Lanza e colaboradores (1997). O material botânico (150-200 mg) foi triturado em um almofariz contendo NL, com auxílio de um pistilo. Na sequência, cada amostra foi transferida para um tubo de eppendorf, e foi adicionado 1mL de tampão contendo o detergente Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e β -Mercaptoetanol. Após homogeneização manual, as amostras foram aquecidas a 65°C por 15 minutos em banho-maria, sendo posteriormente adicionado 700 μ L clorofórmio:octanol (28:1) sendo o material homogeneizado da mesma forma. Após nova centrifugação a 14000 *rpm* por 15 minutos o sobrenadante foi tratado com igual volume de álcool isopropílico gelado e incubado por 24 h a - 20°C, sendo em seguida ~~fe~~ centrifugado a 14000 *rpm* por 10 minutos. O DNA extraído, constituído pelo sedimento, foi mantido em temperatura ambiente até secagem total, sendo em seguida ressuspensão em 100 μ L T.E. (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) com leve agitação.

3.6.2 Quantificação do DNA

Eletroforese em gel de agarose: Alíquotas de cada amostra (10 μ L) foram aplicadas em gel de agarose a 0,8%. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal, em tampão TBE 1X, com voltagem de 5,35 V/cm, por 60 minutos. A seguir, os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), e visualizados em sistema de transiluminação (Transiluminador UV LTA/LTB). A concentração de cada amostra foi definida por comparação visual da banda com um padrão comercial de

DNA λ (25, 50, 75, 100,150 pb). Alternativamente a quantificação foi realizada através da D.O (260 nn) utilizando o espectrofotômetro Denovix Inc.

3.6.3 Análise por RAPD

A estabilidade genética das plantas obtidas *in vitro*, assim como das obtidas em campo, foi avaliada por marcadores RAPD. Os materiais produzidos a partir de multibrotação foram avaliados por comparação com a planta matriz. As reações foram realizadas com a utilização de oligonucleotídeos decâmeros (iniciadores), selecionados, a partir de levantamento bibliográfico prévio. Foram avaliados 70 iniciadores do estoque do NBV, mais 9 cedidos pelo laboratório SERGEN (Serviço de Genética Humana) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, dos quais apenas dois tiveram a sequência determinada, além de outros 10 utilizados anteriormente na família Phytolaccaceae (SEMAGN; STEDE; BJORNSTAD, 2001) totalizando 89 iniciadores (Quadro 2).

A ciclagem foi utilizada segundo Guimarães (2007): 94 °C por 2 min, com 45 ciclos de 94 °C por 1 min, 35 °C por 2 min e 72 °C por 2 min, seguido por uma extensão final de 72 °C por 5 min. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 mL contendo entre 10 a 20 ng de DNA genômico em tampão Tris-HCl a 10 mM (pH 8.8), KCl 50 mM; dNTP 200 mM, solução de iniciadores 50 mM, MgCl₂ 4 mM e Taq polimerase 2U (Neotaq®).

Após a multiplicação das plantas através da cultura, os clones de cada amostra foram avaliados individualmente e comparados entre si e/ou com a planta matriz. Entretanto, os materiais criopreservados e oriundos da embriogênese somática foram apenas comparados entre si. Os produtos da amplificação foram analisados por comparação visual com DNA Ladder (100 pb ou de 1kb), após eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualização com brometo de etídio como descrito no item 3.7.2. Estes experimentos foram repetidos pelo menos três vezes para avaliação da reprodutibilidade do método. Possíveis polimorfismos foram determinados pela alteração do padrão de bandas (presença ou ausência). As imagens foram obtidas com o Sistema de Captura de Imagem L-PIX-ST – Loccus Biotecnologia.

Quadro 2 – Sequências dos iniciadores selecionados para as análises RAPD em *P. alliacea*

Iniciadores	Seqüência (5'-3')	Ref	Iniciadores	Seqüência (5'-3')	Ref
01	CCGGCCTTAC	SEMAGM; STEDJÉ; BJORNSTAD, 2001	47	GTGACCGACT	LAKHANPAUL; VELAYUDHA; BHAT, 2003.
02	AAAACCGGGC		48	ACACCGGAAC	
03	GTCCCAGAGC		49	CAGCCTACCA	
04	GAGCTC GTGT		50	GTAGCCGTCT	K'OPONDO; RHEENEN; MUASYA, 2009.
05	GCGGCTGGAG		51	GAGAGCCAAC	
06	AGTAGACGGG		52	CAGAAGCGGA	
07	TACGATGACG		53	GTCAGAGTCC	
08	GCTGCGTGAC		54	TTCAGGGCAC	
09	CGACCAGAGC		55	ACGGGCCAGT	
10	CTGAAGCGGA		56	CAGTGCCGGT	
11	CTCGGGTGGG	57	GTCCGGAGTG		
12	AGTAGACGGG	58	ACCTCGGCAC		
13	GCTTGTGAAC	59	ACAGCCCCCA	CROCHEMORE; MOLINARI; VIEIRA, 2003.	
14	TGACCGAGAC	60	TGAGCGGACA		
15	TTCCGCGGGC	61	AATCGGGCTG		
16	GTAGACGAGC	62	GTCCACACGG		
17	GTCTTTCAGG	63	CCACAGCAGT		
18	GCGGTTGAGG	64	ACCCCCGAAG		
19	CTTTCGTGCT	65	GGCACCCCTTAC		
20	ATCTGGCAGC	66	ACCAGTTTGG		
21	ACTCCACGTC	67	TGCCGTGAGA		
22	CACCGCAGTT	68	ACGGAAGTGG		SERVGEN - UERJ
23	AGCCAGGCTG	69	CAAAGGGCGG		
24	GGCGTAAGTC	70	CAATCGGGTC		
25	GGGTGACGTT	71	GAACGAGGGT		
26	CCGGGGTTAA	72	AACGGGCGTC		
27	TTAACCGGGG	73	CTTGGCACGA		
28	GAGCACGGGA	74	TGAGGGCCGT		
29	GAGCCCGTAG	75	CTGGCTCAGA		
30	GCAAGTCACT	76	TGCCAAGAGG		
31	TGCCGAGCTG	77	CTGAAGCGCA		
32	GGGTAACGCC	78	GAGAGGCTCC		
33	TCTGTGCTGG	79	CTGGTGCTGA		
34	CCACAGCAGT	80	GACAGTCCCT		
35	GATGACCGCC	81	ND		
36	TGGACCGGTG	82	ND		
37	GAGGGACCTC	83	ND		
38	ACCCCCGAAG	84	ND		
39	GATGACCGCC	85	ND		
40	TTCCCCCAG	86	ND		
41	ACCGCGAAGG	87	ND		
42	CTTCACCCGA	88	GGGTAACGCC		
43	CCCGGCATAA	89	GTAGACCCGT		
44	AGGGGTCTTG	-	-	-	
45	ACGCCCAGGT	HU et al., 2008	-	-	-
46	CCACACTACC		-	-	-

Legenda: ND = Sequência não definida.

3.7 Análise do Perfil fitoquímico e monitoramento da estabilidade metabólica

3.7.1 Preparo dos extratos

Extrato aquoso: preparado através de infusão com folhas excisadas de plantas mantidas no telado e de plantas produzidas *in vitro*. O material vegetal sofreu dessecação em estufa por 48h à 60°C e extraído por infusão com água destilada na proporção de 200 g/L. (Figura 4 e 6), sendo a concentração do extrato foi determinada com base no peso seco. As folhas rasuradas foram preparadas em água deionizada a 100 °C, concentração de 10 mg/ml, e armazenadas em erlenmeyer, protegido da luz. A seguir, a infusão foi mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente, sendo então filtrada com auxílio de papel de filtro e funil de vidro e estocada a baixa temperatura (- 18 °C).

Extrato etanólico (absoluto P.A.) de folhas secas (plantas de campo) e extrato hidroalcoólico de folhas e raízes (secas) de plantas de campo e *in vitro*: as folhas e as raízes (secas - 1g) foram trituradas com auxílio de um pistilo e almofariz. Em seguida foram extraídas por maceração com álcool etílico absoluto P.A. ou álcool:água destilada 70% (v/v). O material foi mantido no escuro em temperatura ambiente por uma semana. A solução resultante foi filtrada com auxílio de funil e algodão e evaporado sobre pressão reduzida (Marconi MA 120), em seguida. Para garantir a remoção total do solvente do extrato hidroalcoólico, o extrato foi colocado em banho-maria à aproximadamente 65°C até a total evaporação da água.

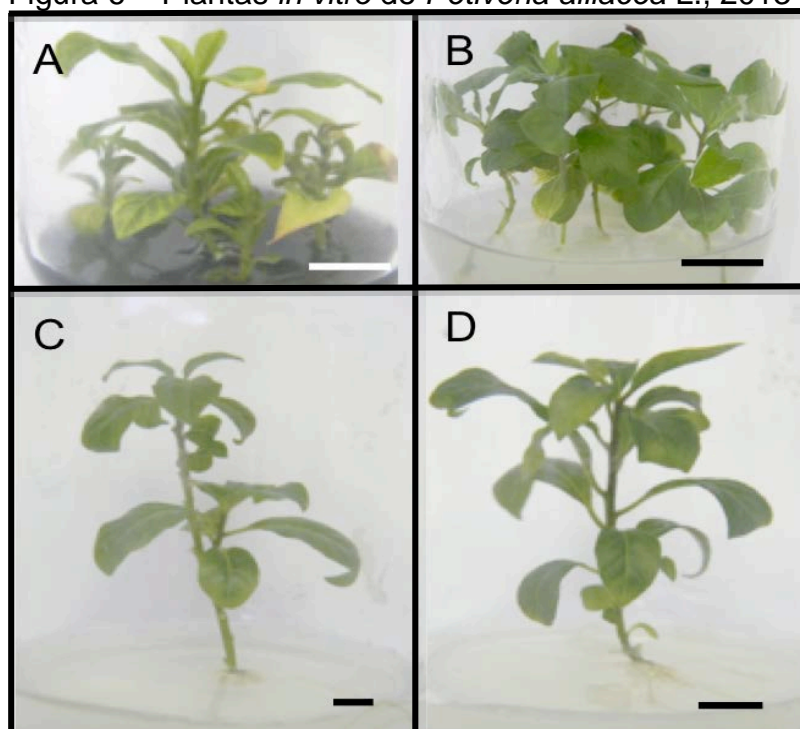
3.7.2 Análises cromatográficas

Cromatografia em coluna de sílica: para o preparo da coluna, a Sílica 60 (70-230 mesh) Vetex[®] foi suspensa com em hexano e, com ajuda de um funil, foi transferida cuidadosamente para uma coluna de vidro (50cm x 2,5cm). Os extratos etanólicos foram redissolvidos em etanol absoluto e evaporados sobre pressão reduzida junto com 15g da sílica, para formar uma pastilha e foram aplicados lentamente na coluna,

sendo submetidos ao fracionamento com ciclohexano/acetato de etila (8:2 v/v), hexano (100%), diclorometano (100%) e acetato de etila (100%).

Cromatografia em camada delgada (CCD): as diferentes frações, obtidas na cromatografia em coluna de sílica (hexano, diclorometano e acetato de etila), extrato etanólicos (com ou sem adição dos polissulfetos) e extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de plantas de campo (secas ou frescas) e folhas e raízes *in vitro* (material seco) foram aplicadas em placas de CCD (10 cm x 10 cm) ou (10 cm x 20 cm) de sílica gel 60 (Merck, Alemanha). As amostras foram resuspensas em metanol de capilares de vidro as amostras foram aplicadas a uma distancia de 1 cm da margem inferior foram realizadas duas aplicações no mesmo ponto para fins de concentração da amostra. A placa foi colocada para secar sob temperatura ambiente. A cromatografia foi realizada em cuba de vidro com tampa, em temperatura ambiente, utilizando-se diferentes fases móveis (Quadro 3). Ao final da corrida as cromatoplasmas foram secas em estufa (Estufa Tecnal, TE – 393/1, Ltda., Brasil) a 50°C, por três minutos e a revelação das cromatoplasmas foi obtida com aspersão de solução alcoólica de ácido sulfúrico a 10% (v/v) ou solução alcoólica de vanilina Vetec® a 1% (p/v) seguidas da solução de ácido sulfúrico acima citada, em ambos os casos as placas foram aquecidas a 100 °C por x min em placa de aquecimento marca e modelo.

Figura 6 – Plantas *in vitro* de *Petiveria alliacea* L., 2013



Legenda: A – Magé (MG), B – Niterói (NT), C – Marechal Hermes (MH) e D – Vila Isabel (VI). Barra = 1 cm

Fonte: SOARES et al., 2013.

Quadro 3 – Sistemas de solventes utilizados na CCD para eluição dos extratos da população NT de *P. alliaceae*.

Sistema	Fase móvel	Proporção (v:v)
1	n-butanol:etanol absoluto:água destilada: ácido acético glacial	60:10:20:0,5
2	acetato de etila:acetona:água destilada	25:8:3 25:8:2 25:8:4 25:10:3 30:10:3
3	acetato de etila	100
4	acetato de etila:metanol	25:75 10:90 90:10 90:5 90:2,5 75:25
5	acetato de etila:metanol:água destilada	90:10:2 90:15:5
6	n-butanol:etanol absoluto:água destilada: ácido acético glacial	60:10:20:0,5
7	hexano:diclorometano	90:10
8	metanol	100

Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à espectrometria de Massas (CG-EM): com base em resultados anteriores (SOARES, 2011), foram selecionados os extratos com maior diversidade química para a comparação dos perfis por CG-EM, em função dos compostos voláteis presentes. Assim, os extratos etanólicos e acetato de etila foram utilizados para a detecção de DTS em folhas e raízes de plantas de campo e materiais *in vitro* das diferentes populações. Foram analisados em cromatógrafo de fase gasosa, acoplado a um espectrômetro de massa QP2010 (CG-EM) (Shimatzu, Japão), equipado com coluna capilar RTX-5ms 30m x 0,25mm x 0,25µm (Restek, USA). A programação da temperatura iniciou-se em 80°C, com aumento a uma taxa 10°C por minuto, até 300°C, permanecendo nesta temperatura por 12 minutos. O gás Hélio foi empregado como gás de arraste, com vazão

constante de $1,52 \text{ mL min}^{-1}$, injeção em modo *split* de 1:10 e temperatura do injetor a 230°C . A quantificação relativa dos componentes foi determinada por detector de impacto eletrônico calibrado a $0,70 \text{ kV}$, à temperatura de 300°C , modo TIC (*Total ion chromatogram*) sugestão com aquisição a cada $0,5$ segundos e faixa de varredura de $40 - 600 \text{ m/z}$.

Os extratos citados anteriormente e os das diferentes populações foram avaliados em cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectro de massa (456GC-TQ) (BRUKER, EUA) na mesma programação apresentada anteriormente.

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de iodo (CLAE-DAD):

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em um cromatógrafo Dionex, modelo Ultimate 3000, equipado com um detector de rede de diodos e coluna ACCLAIM C18 (Dionex Bonded Silica Products, $5 \mu\text{m}$, 120 \AA , com dimensão de $4,6\text{mm I.D}$ 250mm) à temperatura ambiente e com fase móvel água Milliq:acetonitrila com a seguinte programação (0-1min 90:10; 1-25 min 90:10 à 0:100, 25-36 min 0:100; 36-44 min 0:100 à 90:10 e 44-45 min 90:10 com fluxo de 1mL/min , observado nos comprimentos de luz UV e observação dos sinais na região do UV em $230, 254, 300$ e 340 nm. , adaptado Hernández (2014). O monitoramento dos polissulfetos foi realizado pela identificação dos diferentes tipos de polissulfetos usando os padrões: DMS, DDS e DTS, adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co[®]. (Milwaukee, WI, USA).

3.8 Avaliação do potencial genotóxico e anti-genotóxico

3.8.1 Extração do DNA plasmidial

O plasmídeo pUC 9.1 utilizado para análise foi extraído a partir de culturas de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ, portadoras do plasmídeo. As cepas bacterianas foram obtidas a partir da coleção estoque do Laboratório de Radio e Fotobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Esta cepa bacteriana apresenta genótipo deficiente no gene *rec* e proficiente no gene de resistência à canamicina (GUEDES et al., 2006). Esta cepa foi inoculada em meio de cultura Luria Broth (meio LB) com auxílio de alça de inoculação. Assim, pequena quantidade da cultura do estoque em glicerol foi semeada, por esgotamento, no meio LB sólido com ampicilina a 50 μ g/mL e canamicina a 10 μ g/mL, e incubada *overnight*, a 37 °C, a fim de se obterem colônias isoladas. Uma dessas colônias foi selecionada com auxílio de alça de inoculação e foi repicada em meio LB líquido, com a mesma concentração de antibióticos existente no meio sólido, e foi incubada a 37 °C, por 16-18 horas, sob agitação (160 rpm), visando à obtenção de culturas na fase estacionária de crescimento. O DNA plasmidial PUC 9.1 foi extraído utilizando kit para extração plasmidial da Invitex (*Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two*). A quantificação do DNA obtido foi realizada em espectrofotômetro, sob luz ultravioleta, com leitura em comprimento de onda de 260 nm. O DNA plasmidial obtido, foi estocado a -20 °C, por, no máximo, uma semana.

3.8.2 Tratamentos do plasmídeo com os extratos aquosos

Avaliação da potencialidade genotóxica: método realizado segundo Soares (2011), com modificações nas concentrações, visando à padronização com *P. alliaceae*: Soluções contendo 100 ng de DNA plasmidial (PUC 9.1) foram tratadas com diferentes concentrações (1,0 – 5,0 – 10,0 mg/L) dos extratos aquosos das plantas de campo e das plantas *in vitro* das diferentes origens estudadas.

Avaliação da potencialidade antigenotóxica: Foram utilizadas soluções contendo 100 ng de DNA plasmidial (pUC 9.1) tratadas com cloreto estanoso a 1,11 μM (controle positivo) e com diferentes concentrações (1,0 – 5,0 – 10,0 mg/L) dos extratos aquosos de plantas de campo e plantas *in vitro*, a partir das diferentes origens estudadas. Em ambos os testes realizados, cada reação foi mantida em eppendorf de 200 μL , com volume final de 10 μL , incubados por 45 minutos em temperatura ambiente, sendo, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de agarose.

3.8.3 Eletroforese em gel de agarose

Todas as reações foram incubadas em temperatura ambiente por 1 hora e, ao final desse tempo, alíquotas de cada amostra (10 μL) foram aplicadas em gel de agarose a 0,8%. O gel foi submetido à eletroforese seguindo protocolo descrito no item 3.6.2. Os perfis eletroforéticos das amostras foram comparados visualmente e os géis foram quantificados através do programa Image J versão 1.33u.

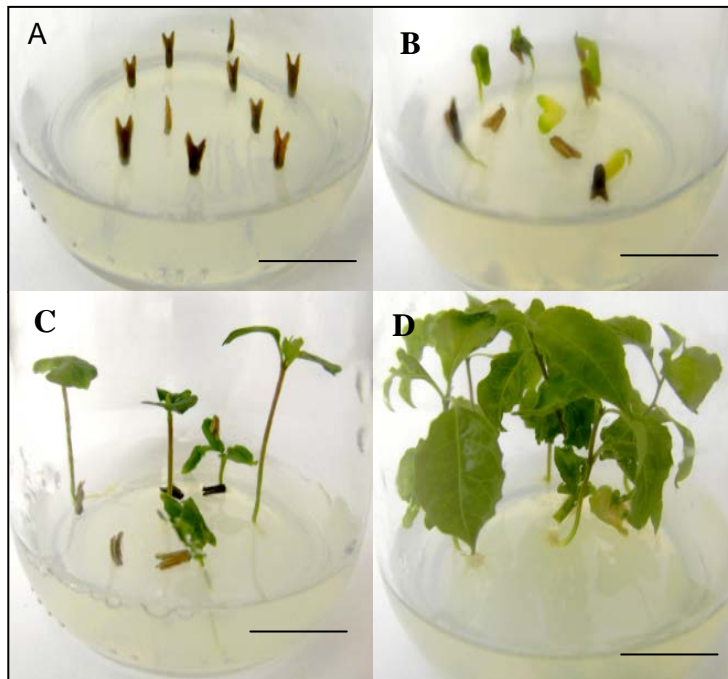
4 RESULTADOS

4.1 Micropropagação

A primeira etapa no estabelecimento da cultura foi a descontaminação das sementes. O protocolo estabelecido em trabalho anterior foi aplicado nas diferentes populações. As sementes foram inoculadas em meio MS0 suplementado com Benlate® 0,04 g/L e Agrimicina® 300 mg/L, durante uma semana, em seguida os explantes foram transferidos para meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com AIA 0,6 μ M, dando origem a plântulas livres de patógenos, quatro semanas após o início da cultura (Figura 7). A taxa de germinação foi na faixa de 90 a 100%, e as plantas obtidas por germinação foram utilizadas como doadoras de explantes.

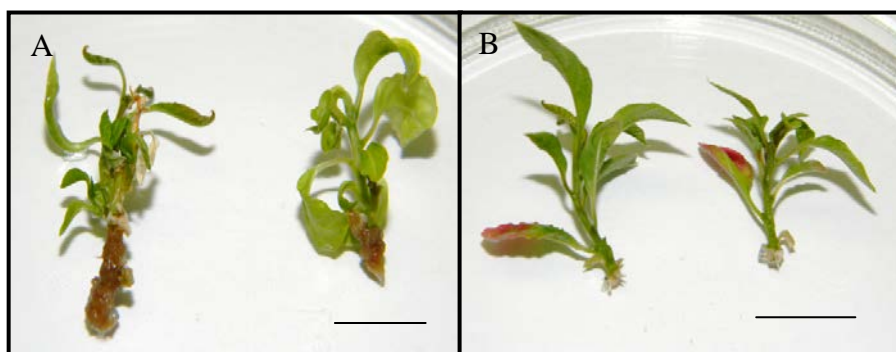
As plantas desenvolvidas após a germinação das sementes da população de Magé demoraram a produzir raízes, em comparação com as demais (cerca de 24 meses). Para suprir esta dificuldade no enraizamento, as plantas foram transferidas para meio MS suplementado com AIB (2,04 – 4,08 – 6,12 μ M), como também para meio MS0 suplementado com carvão ativado 0,2%, sendo observada a formação incipiente de raízes após 30 dias de incubação, em ambas as condições (Figura 8A, B). Independentemente do enraizamento, as partes aéreas das plantas desenvolvidas foram utilizadas como doadoras dos explantes para a micropropagação desta população.

Figura 7 – Etapas de germinação in vitro de sementes de *Petiveria alliacea* L.



Legenda: A - sementes após a inoculação em MS0 suplementado com Agrimicina® 300 mg/L e Benlate® 0,04 g/L; B - plântulas após 1 semana de cultivo no mesmo meio; C - plântulas após 2 semanas de cultivo em meio MS suplementado com AIA 0,6 μ M; D - plantas completas após 3 semanas em meio MS suplementado com AIA 0,6 μ M. Barra = 1 cm.

Figura 8 – Indução de raízes em plantas de *Petiveria alliacea*, da população de MG, obtidas a partir da germinação *in vitro*.



Legenda: A – meio MS suplementado com AIB 4,08 μM :
 B – meio MS suplementado com carvão ativado a 0,2%.
 Barra = 1 cm

4.1.1 Multibrotação

Visando à obtenção de múltiplos brotos e à otimização do processo de cultivo, os ápices caulinares excisados das plantas obtidas das diferentes amostras de sementes foram utilizados como explantes para a avaliação do efeito de fitorreguladores como citocininas (BAP, TDZ) (Tabela 1 e 2) ou auxina (ANA) em diferentes concentrações. Nos experimentos para avaliar os efeitos de citocininas foi observado que, após 60 dias de cultura, o BAP induziu a formação de múltiplos brotos em 22,19 μM (Figura 9A), resposta obtida em explantes de todas as origens, em todas as concentrações testadas. Em relação ao TDZ houve diferença na produção brotos/explante dependendo da população avaliada, mas formaram-se brotos de difícil individualização em todas as concentrações testadas. Em relação ao efeito de auxinas, observou-se que apenas ANA (0,1 μM) induziu a expansão foliar e o alongamento dos brotos em todas as amostras (Figura 9B). Em amostras da população MG observou-se alongamento nas folhas e a formação de brotos deformados nas concentrações mais baixas do fitorregulador (0,45 e 1,36 μM) (Figura 9C e 9D). Além disso, calos friáveis foram observados em todas as amostras que vieram de culturas contendo BAP ou TDZ, quando inoculados em meio MS suplementado com AIA 0,6 μM (Figura 9E e 9F).

Tabela 1 – Efeito de diferentes concentrações de BAP, na multiplicação de ápices caulinares de *Petiveria alliacea* L. excisados (plantas germinadas a partir de sementes) das populações estudadas após 60 dias de culturas in vitro.

População (Cód)	BAP (μ M)	Regeneração (%)	Número de Brotos/explantes	Altura dos Brotos	Calogênese (%)
NT	4,44	90	$2,3 \pm 0,3^a$	$1,3 \pm 0,1^a$	30
	13,32	95	$2,4 \pm 0,3^a$	$1,0 \pm 0,1^a$	35
	22,19	95	$4,2 \pm 1,0^b$	$1,4 \pm 0,1^a$	50
MG	4,44	85	$2,8 \pm 0,5^a$	$1,3 \pm 0,1^a$	40
	13,32	60	$2,8 \pm 0,3^a$	$1,2 \pm 0,2^a$	50
	22,19	85	$3,1 \pm 0,5^a$	$1,3 \pm 0,1^a$	50
MH	4,44	80	$1,9 \pm 0,1^a$	$1,1 \pm 0,1^a$	35
	13,32	90	$3,7 \pm 0,5^a$	$1,2 \pm 0,1^a$	50
	22,19	95	$4,2 \pm 0,5^b$	$1,2 \pm 0,1^a$	50
VI	4,44	80	$2,0 \pm 0,3^a$	$1,5 \pm 0,2^b$	40
	13,32	90	$2,2 \pm 0,3^a$	$1,2 \pm 0,1^a$	40
	22,19	75	$2,7 \pm 0,6^a$	$1,1 \pm 0,2^a$	60

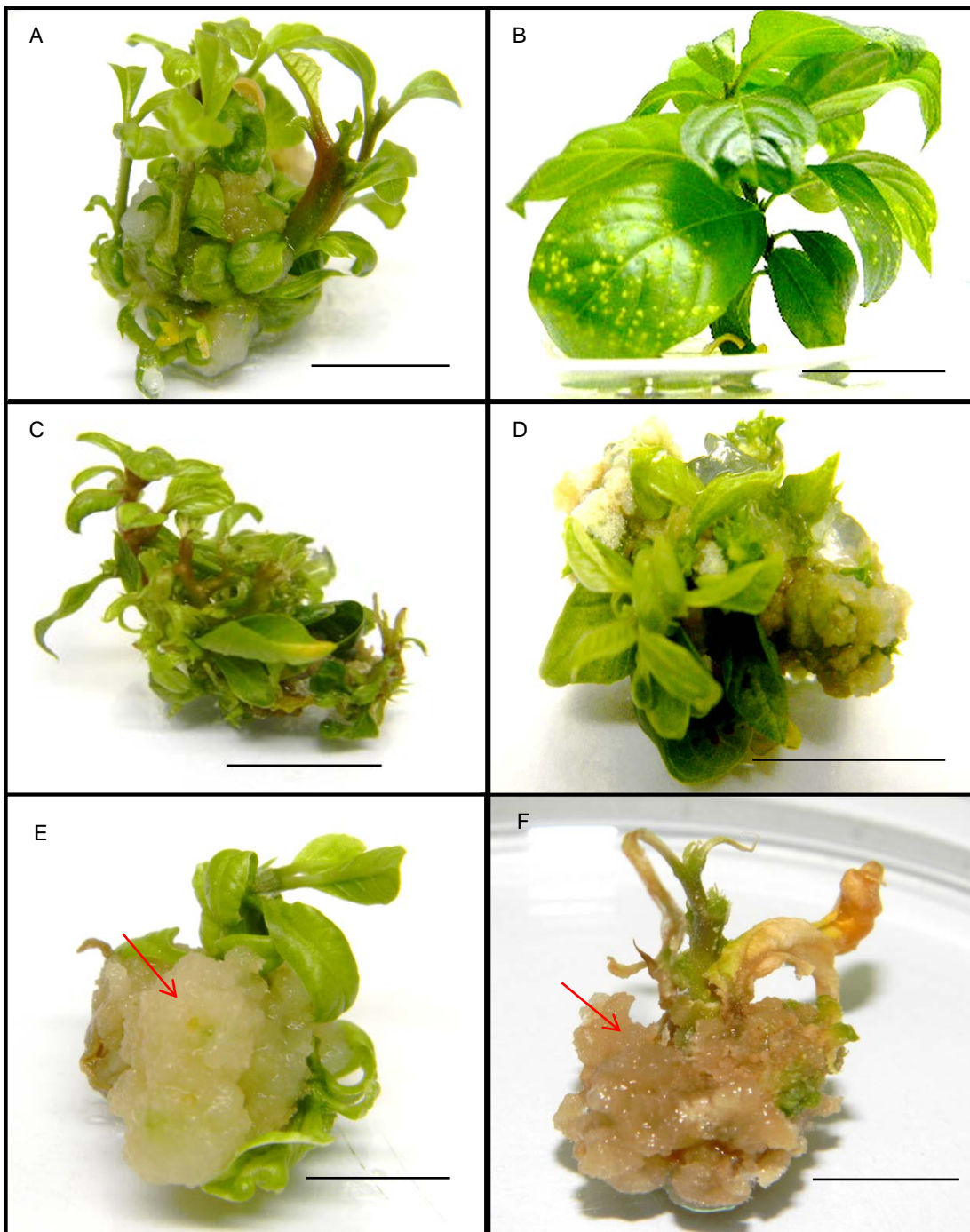
Nota: Dados representam as percentagens e médias \pm erro padrão de amostras com $n = 20$. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna. O número de brotos foi avaliado por ANOVA e Tukey-Kramer ($p < 0,05$) e o tamanho dos brotos foi avaliado por Kruskal – Wallis e Dunn ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Efeito de diferentes concentrações de TDZ, na multiplicação de ápices caulinares de *Petiveria alliacea* L. excisados (plantas germinadas a partir de sementes) das populações estudadas após 60 dias de culturas in vitro.

População (Cód)	TDZ (μM)	Regeneração (%)	Número de Brotos/explantes	Altura dos Brotos	Calogênese (%)
NT	0,45	90	$2,6 \pm 0,4^a$	$1,7 \pm 0,1^b$	100
	1,36	100	$3,2 \pm 0,5^a$	$1,1 \pm 0,1^a$	100
	2,27	100	$3,2 \pm 0,4^a$	$1,5 \pm 0,1^a$	100
MG	0,45	90	$2,8 \pm 0,3^a$	$1,4 \pm 0,1^a$	100
	1,36	100	$3,7 \pm 0,4^a$	$1,4 \pm 0,1^a$	90
	2,27	100	$2,6 \pm 0,2^a$	$1,0 \pm 0,0^a$	70
MH	0,45	100	$2,8 \pm 0,4^a$	$1,2 \pm 0,1^a$	100
	1,36	60	$2,0 \pm 0,3^a$	$1,1 \pm 0,0^a$	100
	2,27	90	$2,7 \pm 0,4^a$	$1,3 \pm 0,1^a$	100
VI	0,45	100	$1,8 \pm 0,3^a$	$1,5 \pm 0,1^a$	100
	1,36	100	$4,1 \pm 0,6^b$	$1,7 \pm 0,1^b$	100
	2,27	100	$2,2 \pm 0,2^a$	$1,5 \pm 0,1^a$	100

Nota: Dados representam as percentagens e médias \pm erro padrão de amostras com $n = 20$. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro da coluna. O número de brotos foi avaliado por ANOVA e Tukey-Kramer ($p < 0,05$) e o tamanho dos brotos foi avaliado por Kruskal – Wallis e Dunn ($p < 0,05$).

Figura 9 – Morfogênese in vitro a partir de ápices caulinares de *P. alliacea* em presença de diferentes fitorreguladores após 60 dias de cultura.



Legenda: A - múltiplos brotos em MS suplementado com BAP (4,44 μM); B - expansão foliar em MS suplementado com ANA (0,1 μM); C - alongamento foliar em MS suplementado com TDZ (0,45 μM) amostra de MG; D - aglomerados de brotos em TDZ (1,36 μM) amostra de MG; E - calos friáveis (seta vermelha) em BAP (22,19 μM); F - calos friáveis (seta vermelha) em TDZ (2,27). Barra: 1 cm.

4.1.2 Indução de embriogênese somática a partir de folhas

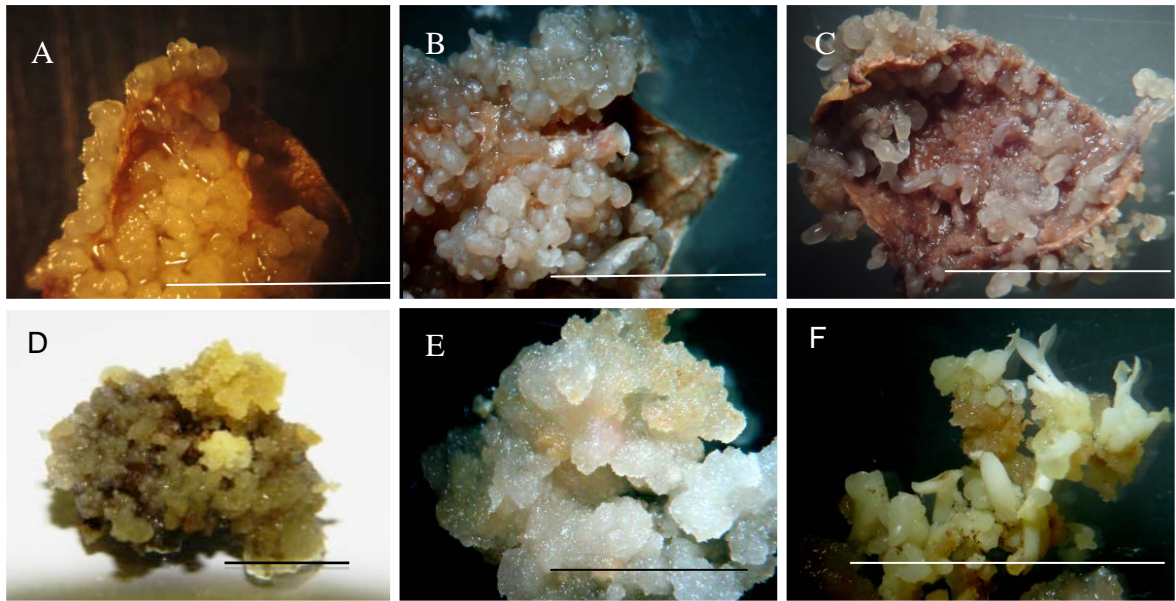
Os segmentos foliares oriundos de plantas *in vitro*, das populações NT, MH, e VI, inoculados em meio MS suplementado com PIC 20 μM , reproduziram o processo de embriogênese somática direta observado em trabalho anterior (CANTELMO et al., 2013). Neste trabalho, os explantes destas populações iniciaram a resposta 120 dias após o início da cultura e apresentaram o desenvolvimento de embriões primários, diretamente a partir das folhas (Figura 10A, B e C). Já folhas da população MG, deram origem a embriogênese somática indireta com formação de calo anterior ao aparecimento dos embriões somáticos. (Figura 10D).

Os embriões primários diretos e indiretos foram transferidos para meio MS $\frac{1}{2}$ solidificado com 0,2% de Fitigel, onde deram origem a novos embriões somáticos.

A taxa de multiplicação dos embriões, após incubação em BOD atingiu de dois a quatro embriões por embrião inoculado, perfazendo mais de 150 embriões ao final de 30 dias (Gráfico 1). Entretanto, nesta condição, foi observado o desenvolvimento de calos friáveis de coloração branca em todas as amostras. Os calos obtidos foram transferidos para meio MS $\frac{1}{2}$, suplementado com 0,2% de Fitigel e mantidos na luz e no escuro.

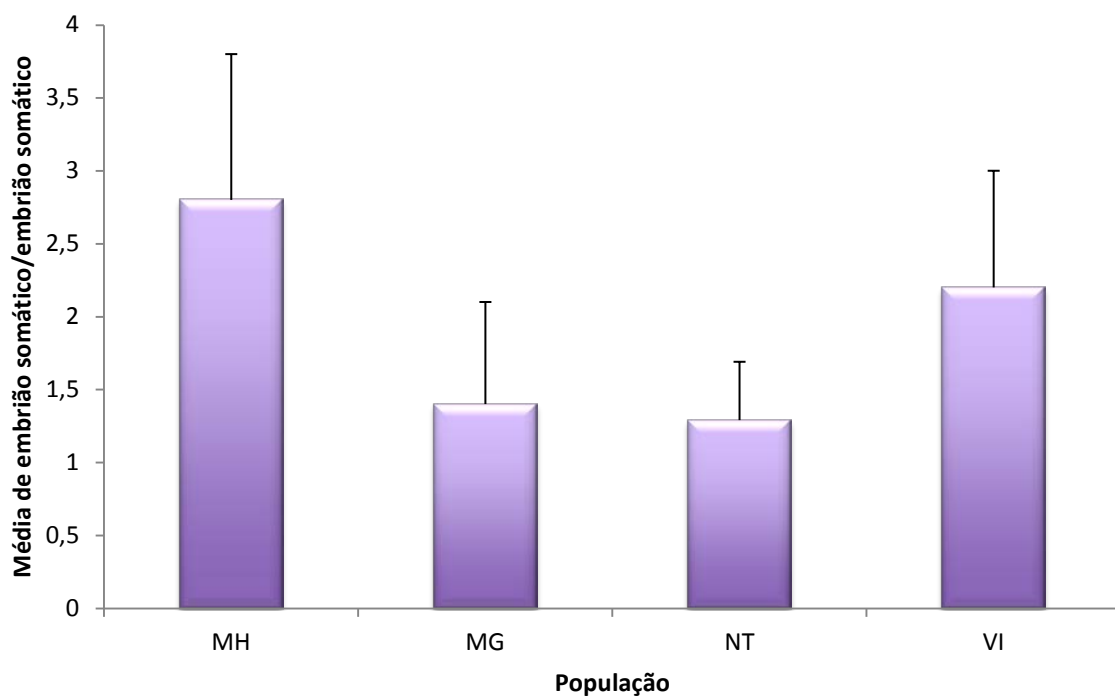
Os calos mantidos na luz apresentaram coloração escura, com aparência oxidada, após 30 dias de cultura. Por outro lado, os calos mantidos no escuro mantiveram a mesma coloração branca inicial (Figura 10E), dando origem indireta a embriões somáticos assincrônicos, com início de conversão após 30 dias de cultura (Figura 10F). A taxa de conversão de plantas vindas de embriões somáticos de folhas foi de 5 a 10% e as plantas convertidas foram usadas para a extração de DNA e extratos vegetais.

Figura 10 – Desenvolvimento de embriões somáticos a partir de folhas das diferentes populações de *P. alliacea* mantidas em BOD por 30 dias.



Legenda: A - embriões somáticos primários a partir de explantes da população NT; B - ídem a partir da população MH; C - ídem a partir da população VI; D - calos formados a partir de explantes foliares população MG; E - embriões somáticos a partir dos calos da população MG; F - ídem a partir de MG. Barra = 1 cm

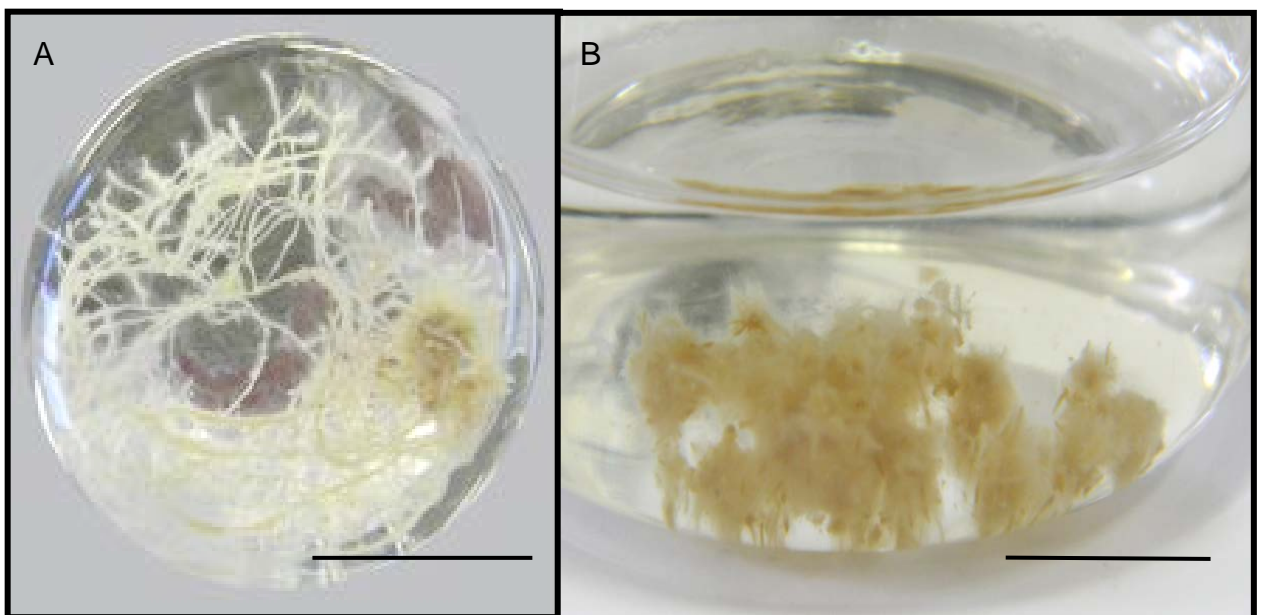
Gráfico 1 – Multiplicação de embriões somáticos a partir de folhas das diferentes populações de *P. alliacea* mantidas em BOD por 30 dias.



4.2 Indução de raízes adventícias

O desenvolvimento de raízes em cultura foi avaliado inicialmente na população AL, por 120 dias, em meio MS líquido suplementado com diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores. Após 30 dias, a formação de raízes individualizadas foi observada somente na presença da menor concentração de AIB 1,02 μM (Figura 11A). Na presença dos outros fitorreguladores, em todas as concentrações testadas, foi observada a formação de aglomerados de raízes, que foram denominados “novelos” (Figura 11B), e atingiam aproximadamente 0,5 - 1,0 cm de diâmetro, após 90 dias de cultura. Após 120 dias, o desenvolvimento de estruturas globulares, dispersas no meio líquido, foi observado em todas as culturas. Na presença dos fitorreguladores ANA, AIA e 2,4D, não foram observadas a formação de raízes individualizadas, apenas a formação de “novelos” em todas as concentrações testadas.

Figura 11: Indução raízes adventícias a partir explantes radiculares de *P. alliacea* da população AL em meio MS suplementado com AIB em diferentes concentrações.



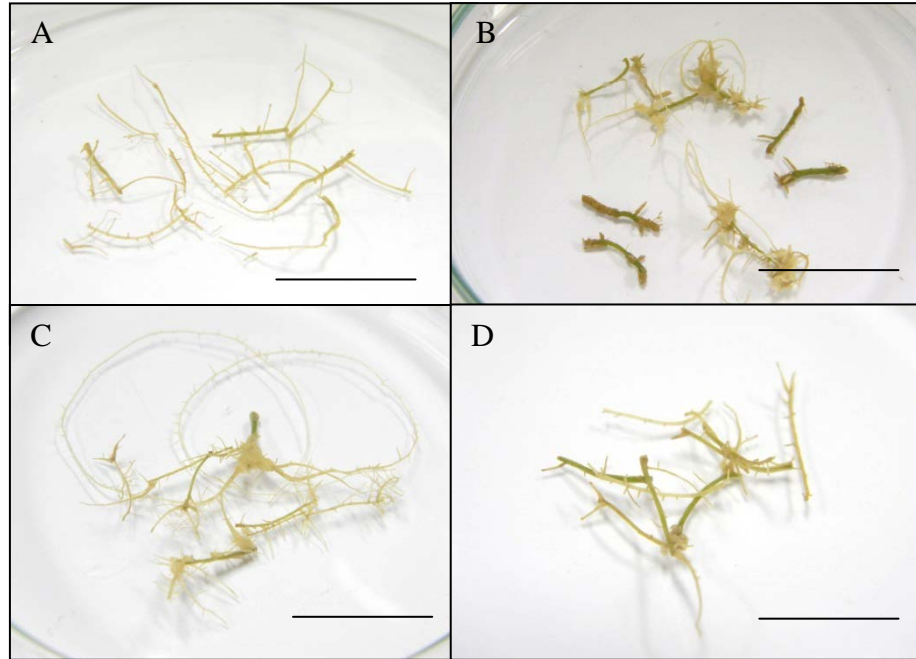
Legenda: A - Crescimento radicular em meio MS suplementado com AIB 1,02 μM ; B - novelos obtidos em todas as populações após 90 dias de cultura em meio MS suplementado com ANA em diferentes concentrações. Barra =1 cm

Por esta razão, e com base na literatura (ROGALSKI et al., 2003; SOUZA; PEREIRA, 2007) o AIB, foi utilizado nos experimentos, visando aumentar a biomassa de raízes das populações NT, MH, MG e VI. Além disso, o efeito sinérgico de outros fatores, como a presença de luz e/ou carvão ativado também foi avaliado quanto à influência no aumento de biomassa.

A avaliação do efeito da luz em culturas líquidas, contendo AIB 1,02 μM , demonstrou que, após 90 dias de cultura em presença de luz, houve aumento da biomassa das populações (AL, NT, VI, MH e MG) (Figura 12 e Gráfico 2). Em ausência de luz também se observou aumento na biomassa, exceto na amostra VI que apresentou diminuição após a terceira subcultura. A amostra MG não foi incluída neste experimento por não produzir biomassa suficiente de raízes no período avaliado. (Gráfico 3). Nesta condição, o meio de cultura das amostras apresentou-se muito viscoso e com coloração amarelada, após 90 dias de cultura novas frentes de investigação (Figura 13A, B, C).

A avaliação do efeito do carvão ativado no desenvolvimento de raízes em plantas *in vitro*, cultivadas em presença de AIB, com o dobro da concentração (2,04 μM) demonstrou que, ao longo de 120 dias de acompanhamento, as amostras avaliadas (VI, NT e AL) apresentaram aumento da biomassa, sendo a amostra AL a que apresentou o maior crescimento (Gráfico 4) e a única a apresentar organogênese direta de brotos (Figura 14B). Foi realizado um teste com carvão e AIB na menor concentração, não houve aumento na biomassa das amostras avaliadas. Todas as raízes apresentaram diminuição da biomassa depois de 30 dias.

Figura 12 – Indução de rizogênese em explantes radiculares das diferentes populações de *Petiveria alliacea*, em meio MS líquido suplementado com AIB 1,02 μ M após 90 dias de subculturas.



Legenda: A – Marechal Hermes (MH); B - Nterói (NT); C – Vila Isabel (VI); D - Magé (MG). Barra = 1 cm

Gráfico 2 – Desenvolvimento de raízes das diferentes populações de *P. alliacea* em meio líquido MS suplementado com AIB 1,02 μ M.

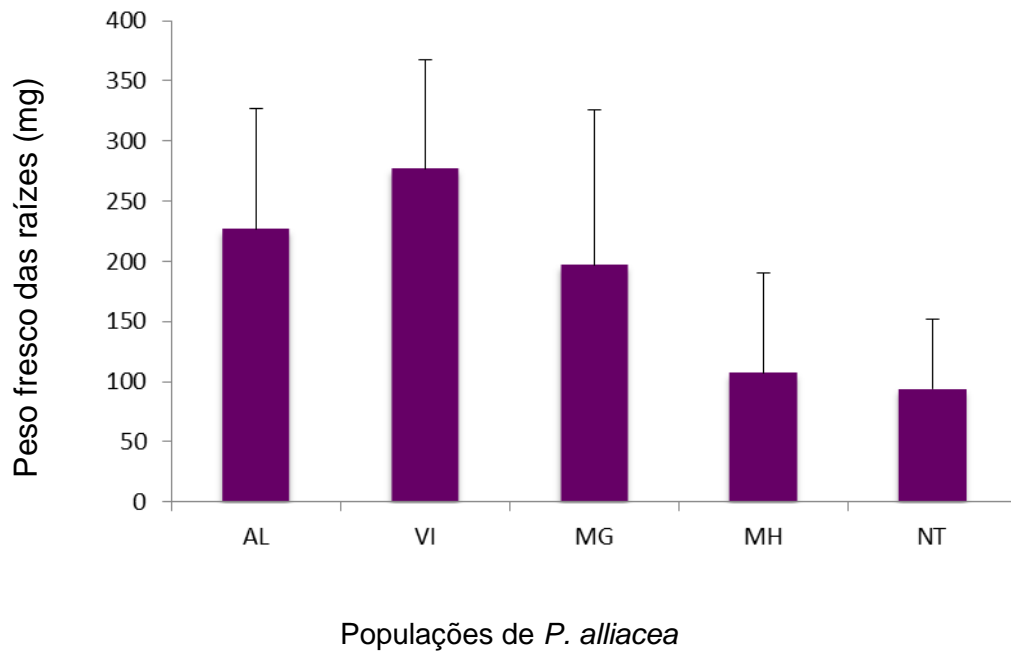


Gráfico 3 – Indução de rizogênese em explantes radiculares de *Petiveria alliacea*, cultivados em meio MS suplementado com AIB 1,02 μ M.

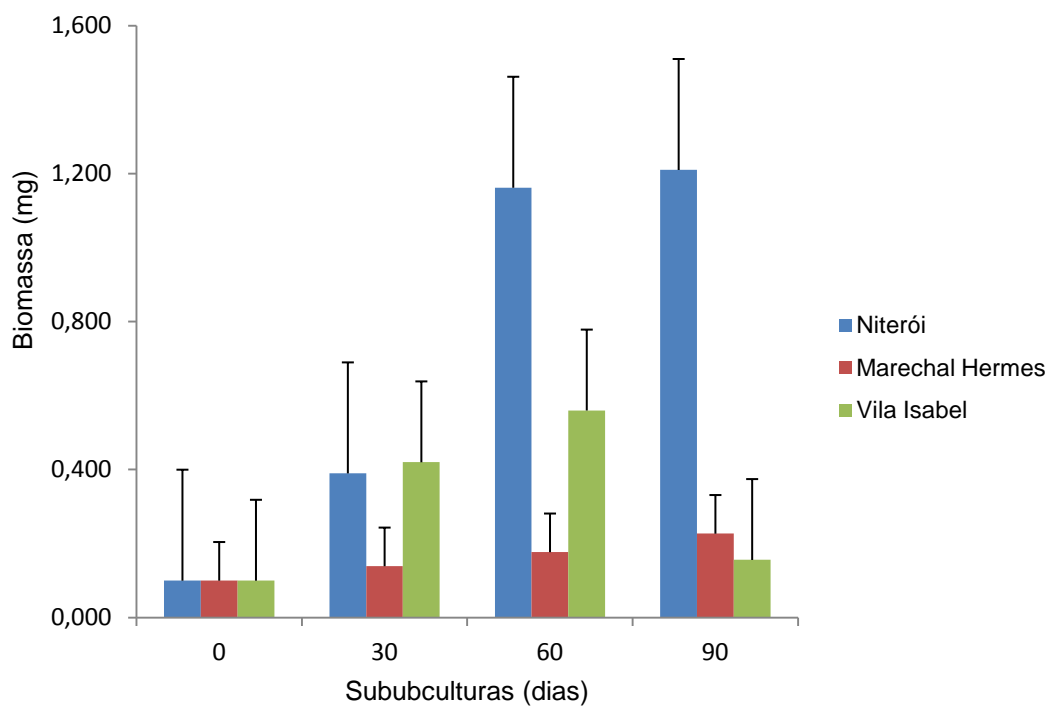
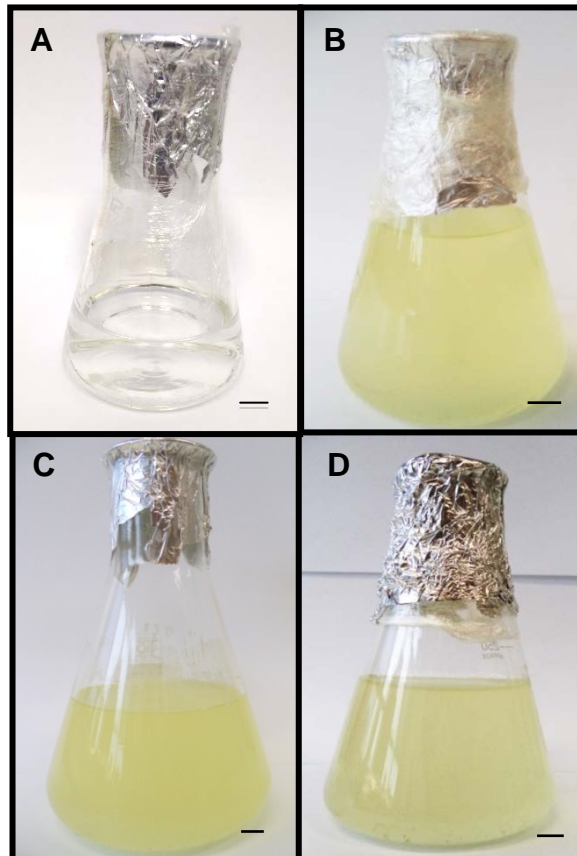


Figura 13 – Meio líquido MS suplementado com AIB 1,02 μM provenientes de subculturas de raízes mantidas no escuro, apresentando diferença na coloração do meio dependendo da amostra avaliada.



A avaliação do efeito do carvão ativado no desenvolvimento de raízes cultivadas em presença de AIB, com o dobro da concentração (2,04 μM) demonstrou que, ao longo de 120 dias de acompanhamento, as amostras avaliadas (VI, NT e AL) apresentaram aumento da biomassa, sendo a amostra AL a que apresentou o maior crescimento (Gráfico 4) e a única a apresentar organogênese direta de brotos (Figura 13B). Foi realizado um teste com carvão e AIB na menor concentração, não houve aumento na biomassa das amostras avaliadas. Todas as raízes apresentaram diminuição da biomassa depois de 30 dias.

Gráfico 4 – Indução de raízes adventícias em explantes radiculares das diferentes populações de *Petiveria alliacea*, em meio MS suplementado com AIB 2,04 μ M com carvão ativado 0,2 % ao longo 120 dias

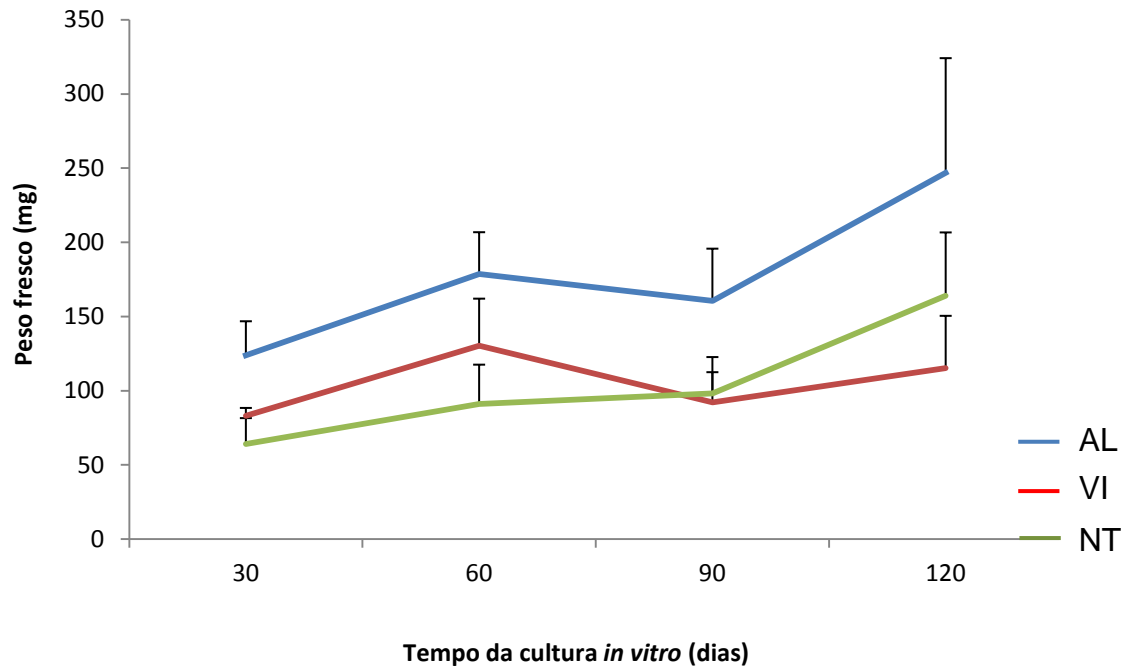
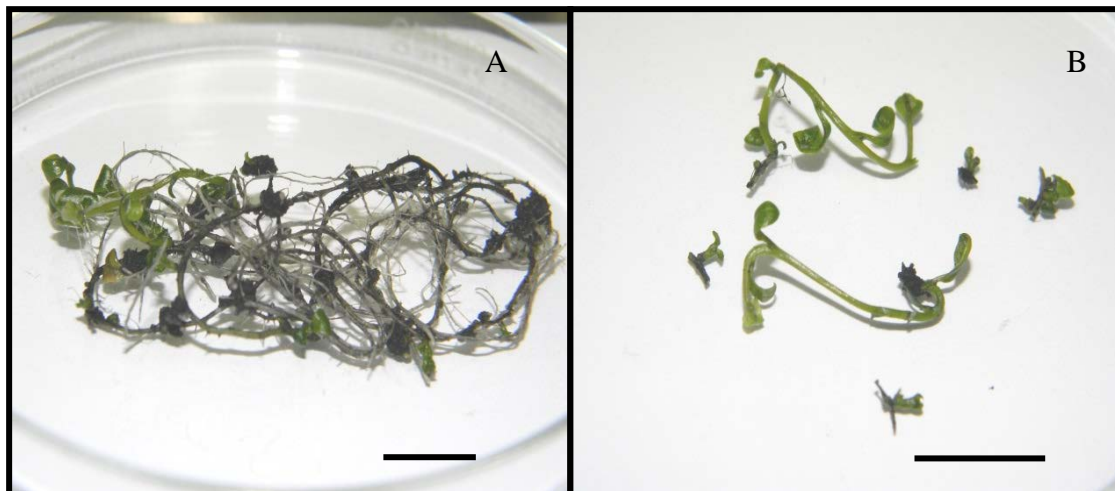


Figura 14 – Indução de raízes adventícias e brotos a partir de segmentos radiculares de plantas in vitro da população AL, em meio MS líquido suplementado com AIB 2,04 μ M.



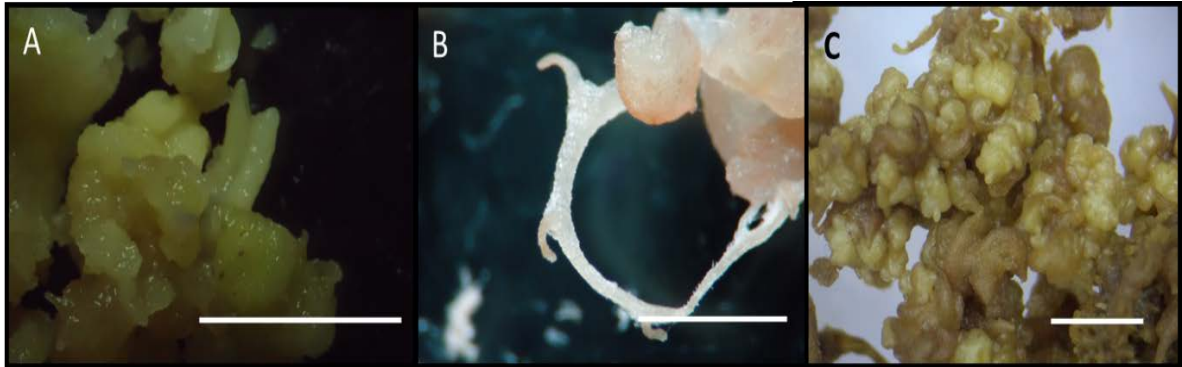
Legenda: A - desenvolvimento de raízes; B - brotos formados a partir das culturas de raízes da população AL, após 90 dias de cultura. Barra = 1 cm

4.2.1 Embriogênese somática a partir de raízes

A partir dos resultados preliminares, indicativos de embriogênese somática, obtidos na cultura de raízes, com a amostra AL, embora as estruturas globulares tenham se formado em todas as concentrações e fitorreguladores testados (Figura 15), o fitorregulador AIB foi selecionado para avaliação das outras amostras de *P. alliacea*, uma vez que, foi o único fitorregulador que possibilitou o desenvolvimento de raízes individualizadas (Figura 11A). Nestes experimentos, a produção de novos ocorreu após 90 dias de cultivo (Figura 16A), mas somente após 120 dias observou-se a formação das estruturas globulares (Figura 16B).

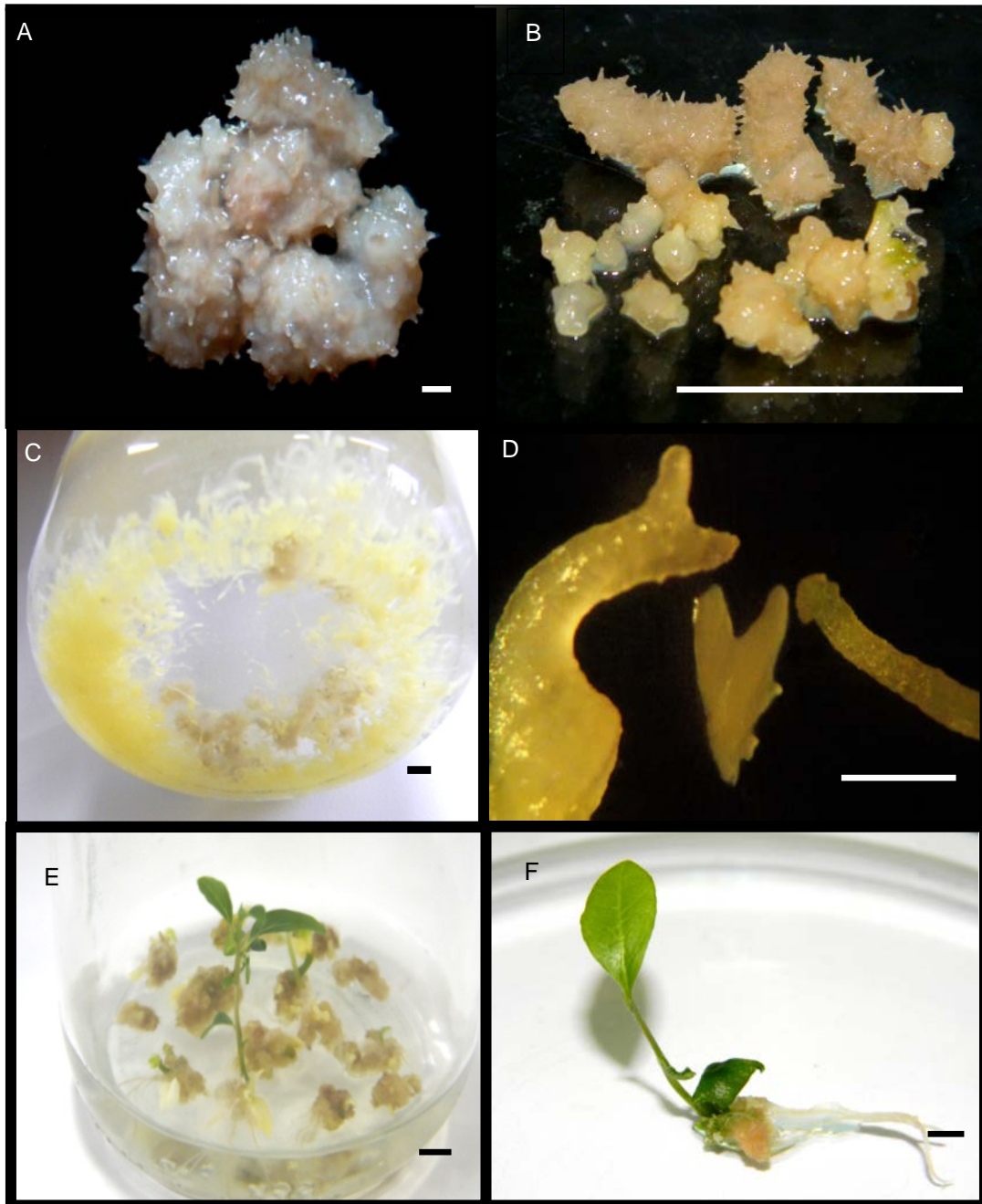
As estruturas globulares formadas nas culturas (Figura 16C) foram identificadas como embriões somáticos (Figura 16D) e a confirmação preliminar foi feita pela conversão a plantas, após a transferência para meio MS $\frac{1}{2}$, solidificado com fitagel 0,2% originando-se plantas completas após 180 dias (Figura 16E - F).

Figura 15 – Embriões somáticos da amostra AL a partir de raízes cultivadas em presença de diferentes fitorreguladores.



Legenda: A - ANA (1,35 μM); B - AIA (5,7 μM) e C - AIB (20,4 μM).
Barra = 1 cm.

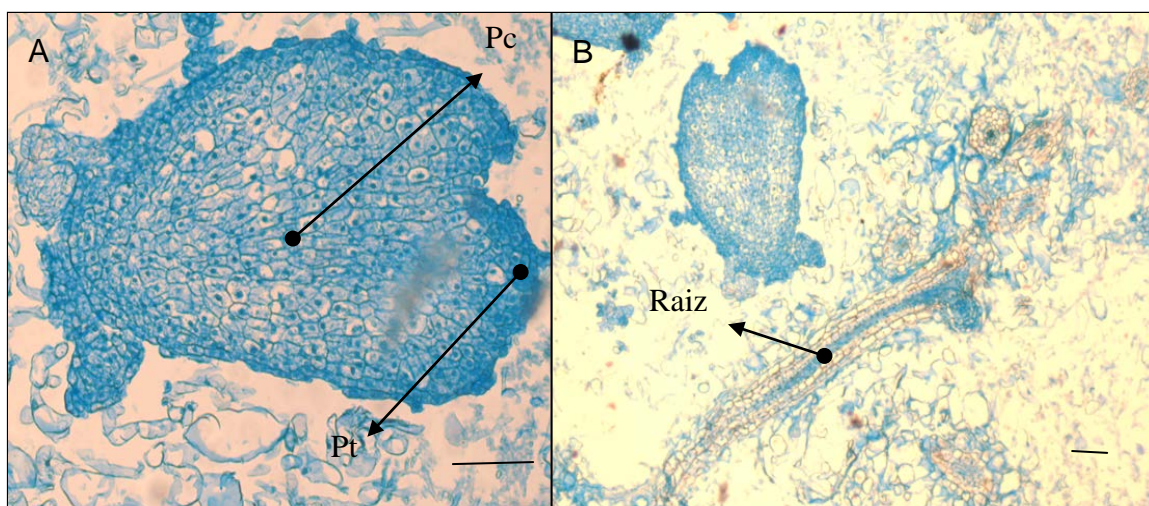
Figura 16 – Morfogênese a partir de segmentos radiculares de *Petiveria alliacea* cultivados em meio MS líquido suplementado com AIB.



Legenda: A - novelos formados na amostra VI, em presença de ANA 2,04 μM após 90 dias de cultura; B - novelos e embriões somáticos formados na amostra VI, em presença de AIB 2,04 μM , após 120 dias de cultura; C - embriões somáticos formados em presença de AIB 20,04 μM ; D - embriões somáticos individualizados, a partir de AIB 20,04 μM ; E - conversão à plantas em presença de AIB 4,08 μM ; F - planta individualizada obtida a partir de AIB 4,08 μM . Barra: A e B = 1 cm. Barra: C e D = 0,5 mm.

A análise histológica realizada com os explantes de raiz a partir de 120 dias de cultura confirmou a formação de embriões somáticos (Figura 17A). Entretanto, foram também identificados centros meristemáticos, a partir dos tecidos vasculares da raiz (Figura 17B), que poderiam originar as gemas radiculares, ou calos, ainda não detectados nas culturas. Entretanto, ainda não foi possível esclarecer a origem dos embriões somáticos a partir de raízes.

Figura 17 - Análise histológica de raízes de *Petiveria alliacea* amostra NT, cultivadas em meio MS líquido suplementado com AIB 20,4 μM , após 120 dias.



Legenda: A - embrião cordiforme; B - centros meristemáticos em início de diferenciação, a partir de tecidos vasculares; Pc = Protocâmbio; Pt – Protoderme. Barra = 1 cm.

Todas as culturas foram monitoradas por até 120 dias, através da avaliação da biomassa de raízes e de embriões, sendo constatada a formação de novos a partir da concentração de 2,04 μM , em todas as populações, independentemente da concentração de AIB utilizada. Entretanto, a produção de embriões variou em função da concentração de AIB e da amostra estudada (Gráfico 5).

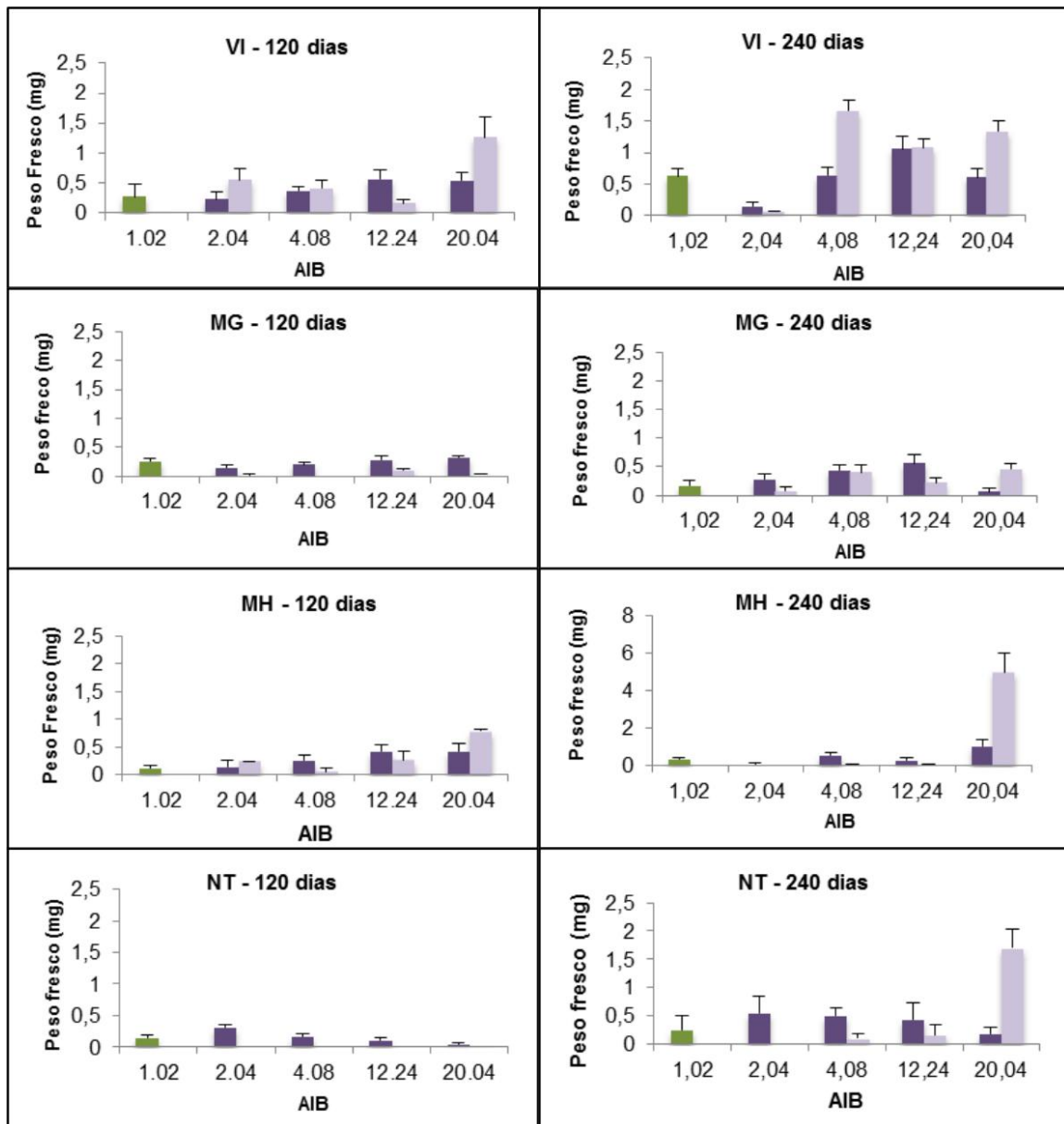
A cada 30 dias, os novos formados foram subcultivados em meio MS líquido com a mesma composição e avaliados mensalmente. Após mais 120 dias, observou-se que a produção de embriões somáticos foi contínua em todas as concentrações hormonais e populações de *P. alliacea* avaliadas (Gráfico 5).

De modo geral, como descrito no item anterior, a suplementação com AIB a 1,02 μM foi a melhor condição para produção de raízes adventícias, enquanto que 20,04 μM de AIB foi a melhor condição para a produção de embriões somáticos.

Os embriões somáticos vindos de raízes foram mantidos em meio MS $\frac{1}{2}$ solidificado com fitagel 0,2% por 30 dias, onde se multiplicavam intensamente, mas a conversão a plantas era muito lenta. A transferência para o meio de manutenção das culturas (MS $\frac{1}{2}$, suplementado com AIA 0,6 μM) (CASTELLAR, 2011), permitiu a continuação da multiplicação e favoreceu a conversão em taxas variáveis de acordo com as amostras. A taxa de conversão chegou a 53% na amostra VI após o cultivo sob temperatura alternada - BOD (Tabela 3).

Em relação à multiplicação dos embriões somáticos em meio semi sólido com metade de seus nutrientes suplementado com AIA (0,6 μM), de forma geral, foi elevada a partir de todas as populações estudadas, mantendo taxas semelhantes às aquelas obtidas em trabalho anterior com embriões de folha da amostra AL (CANTELMO et al., 2013). Dependendo da população, a frequência de multiplicação embriogênica variou de 57 a 78% (Tabela 3). A formação de calo ocorreu em todas as populações, exceto MH e os embriões somáticos desenvolviam pigmentação arroxeadada após 2 semanas (18 a 37%) (Figura 18). Além disso, uma pequena percentagem originava apenas raízes (3 a 7%), sendo que todos os embriões pigmentados originavam plantas completas e fenotipicamente normais (Tabela 3).

Gráfico 5 - Desenvolvimento de raízes adventícias, novos e embriões somáticos nas diferentes amostras de *Petiveria alliacea* após 120 e 240 dias em meio MS líquido suplementado em diferentes concentrações de AIB na presença de luz.



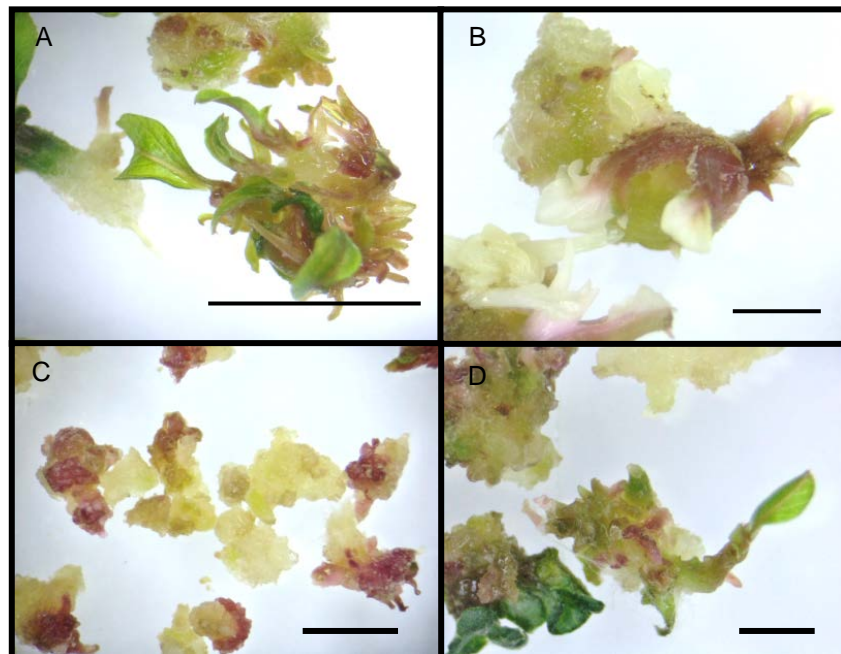
Legenda:

- raízes adventícias
- "novos"
- embriões somáticos.

Tabela 3 - Desenvolvimento de embriões somáticos a partir de raízes de *P. alliacea* cultivadas em BOD 30 dias.

Cod.	Calos	Rizogênese (%)	Pigmentação (%)	Multiplicação (%)	Plantas completas (%)
MH	Não	7	31	59	20
VI	Sim	4	18	57	53
NT	Sim	3	37	78	9
MG	Sim	0	27	58	8

Figura 18 - Embriões somáticos das diferentes amostras de *P. alliacea* obtidos a partir de raízes em meio suplementados com AIB mantidos em BOD durante duas semanas.



Legenda: A) Vila Isabel (VI); B) Niterói (NT); C) Magé (MG) e D) Marechal Hermes (MH)

Barra = 1 cm.

4.3 Criopreservação

Os embriões somáticos formados a partir de raízes das diferentes populações e em diferentes estágios de desenvolvimento foram criopreservados após a vitrificação com PVS2 e foram recuperados em meio MS $\frac{1}{2}$, solidificado com fitagel 0,2%, incubados no escuro por 30 dias e posteriormente transferidos para a luz, sendo subcultivados mensalmente em meio de mesma composição. A viabilidade dos embriões somáticos tratados com PVS2 por 15 minutos foi de 35%, já o tratamento por 30 minutos foi de 85%. Os embriões somáticos das populações de MH, MG e VI não apresentaram viabilidade após o reaquecimento, o que foi comprovado pelo teste de TTC. Os embriões somáticos oxidaram rapidamente e apenas os controles se multiplicaram.

Apenas na população NT houve recuperação após a criopreservação com a formação de calo após 30 dias de cultura no escuro e posterior formação de embriões e raízes, em presença de luz, no mesmo meio de recuperação. A quantificação da recuperação foi realizada após 60 dias de cultura dos embriões somáticos criopreservados.

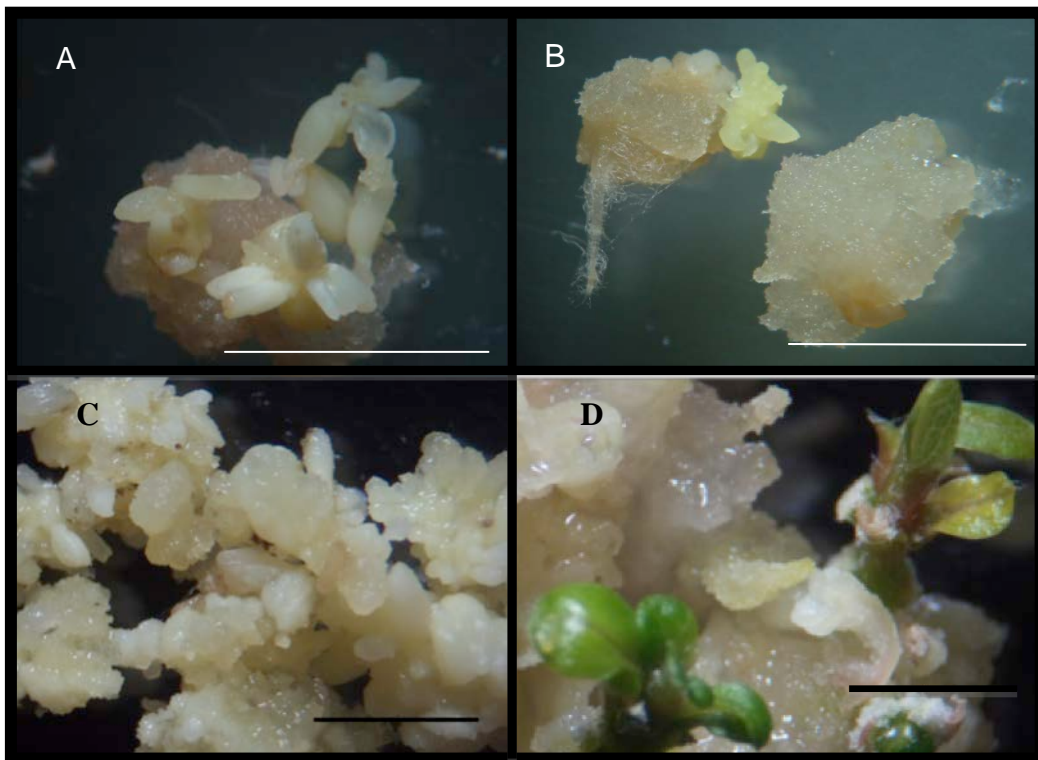
Na avaliação do tempo de exposição ao PVS2, observou-se que tanto materiais tratados por 15 minutos (Figura 19A), como nos materiais tratados por 30 minutos (Figura 19B), ocorreu o desenvolvimento de embriões somáticos retirados do NL, através da multiplicação.

Na avaliação da multiplicação observou-se que o tratamento com PVS2 por 30 minutos sem posterior imersão em NL favoreceu a multiplicação de embriões somáticos chegando a 305, com uma taxa média de dois embriões para cada embrião inoculado, maior que aquela observada nos controles sem este tratamento (Tabela 4).

O tratamento com PVS2 por 30 minutos também favoreceu a recuperação e multiplicação de embriões somáticos criopreservados, chegando a 380, com uma taxa média de mais que dois embriões para cada embrião tratado e imerso em NL (Tabela 4).

Considerando-se o número total de embriões somáticos convertidos após a criopreservação foram obtidas 45 plantas após o tratamento em PVS2 - 15 minutos e 20 plantas após o tratamento em PVS2 - 30 minutos, perfazendo uma taxa de conversão em torno de 10% (Tabela 4 e Figura 19C e D).

Figura 19: Recuperação após criopreservação de embriões somáticos formados a partir de raízes de *Petiveria alliacea* com 30 dias.



Legenda: A - tratamento com PVS2 por 15 minutos; e B - tratamento com PVS2 por 30 minutos. Material criopreservado com 60 dias: C – tratamento com PVS2 por 15 minutos e B – tratamento com PVS2 por 30 minutos. Barra = 0,5 cm.

Tabela 4 - Viabilidade de embriões somáticos da amostra NT tratados por PVS2 e recuperação, após 60 dias de cultura em meio MS com a metade de seus nutrientes solidificado com fitagel 0,2% dos embriões criopreservados.

Tempo de exposição (PVS2)	-NL			+NL		
	Viabilidade (%) *	N° ES/ES	N° total de ES	Viabilidade (%) *	N° ES/ES	N° total de ES
0'	100	1,6 ± 0,9	250	-	-	-
15'	80	1,2 ± 0,7	185	35	0,8 ± 0,4	130
30'	40	2,0 ± 1,2	305	85	2,5 ± 1,4	380

Legenda: * TTC realizado imediatamente após o descongelamento; N° ES/ES expresso como "média ± desvio padrão" com N = 50

4.4 Monitoramento da estabilidade genética

Plantas de campo das diferentes origens foram utilizadas na extração de DNA, contabilizando as quatro amostras de plantas campo e o DNA foi quantificado na faixa de 100 a 150 ng por extração.

Inicialmente foram avaliados 89 oligonucleotídeos iniciadores utilizando-se o DNA de todas as populações para seleção dos iniciadores com o maior número de fragmentos amplificados. Foram gerados 776 produtos (presença ou ausência de bandas) no total.

Com base nestes marcadores e usando o índice de semelhança de Jaccard, foi possível comparar a similaridade e diversidade entre as amostras. Assim, as populações de MG e NT mostraram maior similaridade entre si ($J = 0,4865$), enquanto que MH foi mais similar à VI ($J = 0,4529$). Os resultados foram obtidos utilizando-se dados binários (presença ou ausência de bandas), observados nas quatro populações, que formaram dois grupos distintos no dendrograma (Figura 20). Estes resultados indicaram a diversidade de populações de campo e permitiram a seleção de iniciadores capazes de discriminar variedades, que foram avaliados no monitoramento genético das culturas *in vitro*.

Para a avaliação da sensibilidade dos iniciadores selecionados foi realizado um estudo comparativo da diversidade genética entre as quatro amostras das populações de *P. alliacea* utilizadas neste trabalho (NT, MG, MH e VI) (Figura 21). Nestes experimentos, iniciadores 87, 88, 61 e 55, forneceram o maior número de fragmentos polimórficos amplificados dependendo da amostra avaliada, na amostra de NT, o iniciador 87 e 61 (Figura 21A e C) não forneceu fragmentos de amplificação nas concentrações de 5 ou 10 ng, entretanto nos iniciadores 88 e 55 foi possível a obtenção de bandas. Nas outras amostras, em ambas as concentrações avaliadas, foi possível observar uma acentuada formação de bandas e o número de bandas obtidas por iniciador foi quantificado em cada amostra testada (Tabela 5).

A seguir foram selecionados vinte seis iniciadores que produziram o maior número de fragmentos polimórficos nas amostras de campos, gerando 281 produtos (Tabela 5).

Entretanto, estes iniciadores selecionados, quando aplicados nas plantas *in vitro* resultaram em perfis de bandas diferentes daqueles obtidos anteriormente. Por esta

razão, foi realizada nova seleção utilizando-se os 89 iniciadores do estoque do laboratório, nas amostras de plantas *in vitro* (Quadro 4).

O material *in vitro*, a partir das diferentes amostras, avaliado por RAPD constituiu-se de clones gerados após a multibrotação (BAP e TDZ), ou a partir de embriões somáticos, tanto de folhas, como de raízes. A escolha dos iniciadores para utilização com as plantas obtidas na cultura *in vitro*, foi feita com base nos iniciadores que amplificavam fragmentos em todas as populações. Assim, seis iniciadores (23, 49, 59, 68, 88 e 89) foram utilizados nas diferentes amostras produzidas *in vitro*. Entretanto, apesar de ocorrer a amplificação nas amostras *in vitro*, os iniciadores selecionados não amplificaram o material de campo quando foram comparados. Os iniciadores 89, 88, 49 e 59 não amplificaram as amostras MH e MG, a partir de TDZ, entretanto, foram capazes de amplificar os clones da amostra VI formados em resposta a BAP (Figura 22). Na amostra de NT multiplicada com o fitorregulador BAP também foi possível a identificação de bandas polimórficas com os iniciadores 49, 89 e 88, quando os clones foram comparados entre si. Os clones das amostras de VI amplificados com os iniciadores 49, 59 e 89 também apresentaram polimorfismos quando comparados entre si (Figura 23).

As amostras de embriões somáticos criopreservadas da população de NT, que passaram por PVS2 nos diferentes tempos (15' e 30' minutos) foram amplificadas com os iniciadores 5, 9 e 11, e com o iniciador 23 que amplificou estas amostras apresentando diferenças na produção das bandas (Figura 24).

Plantas convertidas a partir de embriões somáticos derivados de folhas e não criopreservados das amostras NT foram monitoradas geneticamente, apenas com o iniciador 88, que forneceu o maior número de bandas nos clones *in vitro* das amostras de VI e MG. Não ocorreu amplificação nas amostras de plantas *in vitro* NT e MH, com nenhum outro iniciador testado. Com o iniciador selecionado, não foi detectado presença de polimorfismo com as amostras avaliadas. (Figura 25).

Neste trabalho foram determinados cinco marcadores RAPD (55, 61, 87 e 88) para estudar a diversidade genética da espécie. Entretanto, estes marcadores não foram adequados para monitorar os clones obtidos por processos de regeneração diferentes, tais como micropropagação com uso de fitorreguladores, embriogênese somática, ou plantas recuperadas após a criopreservação. Para estes materiais produzidos biotecnologicamente, foram identificados outros nove marcadores (5, 9, 11, 23, 49, 55, 59, 88, 89), que poderiam ser utilizados para monitorar os clones oriundos de cada processo de regeneração avaliado, dependendo da amostra. Assim, apesar dos processos de regeneração induzidos por fitorreguladores originarem plantas com alto índice de variação somaclonal, a identificação destes marcadores disponibiliza uma ferramenta importante de controle dos clones produzidos, em função da finalidade da sua produção.

Figura 20 - Dendrograma de similaridade entre as diferentes populações de *Petiveria alliacea*.

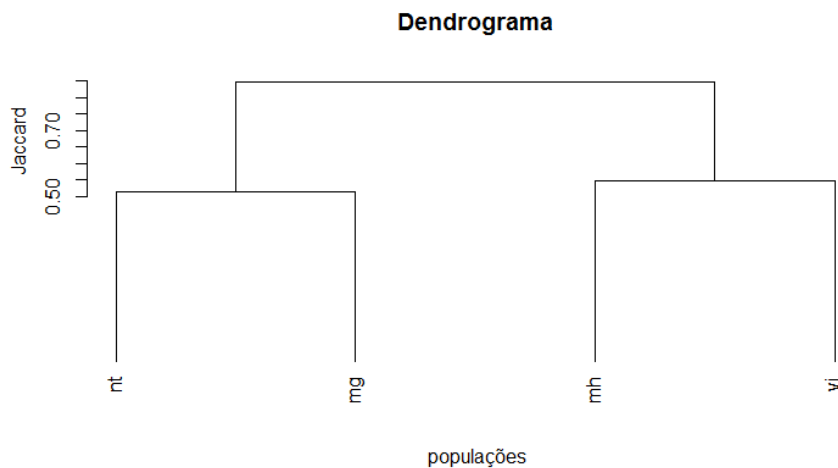
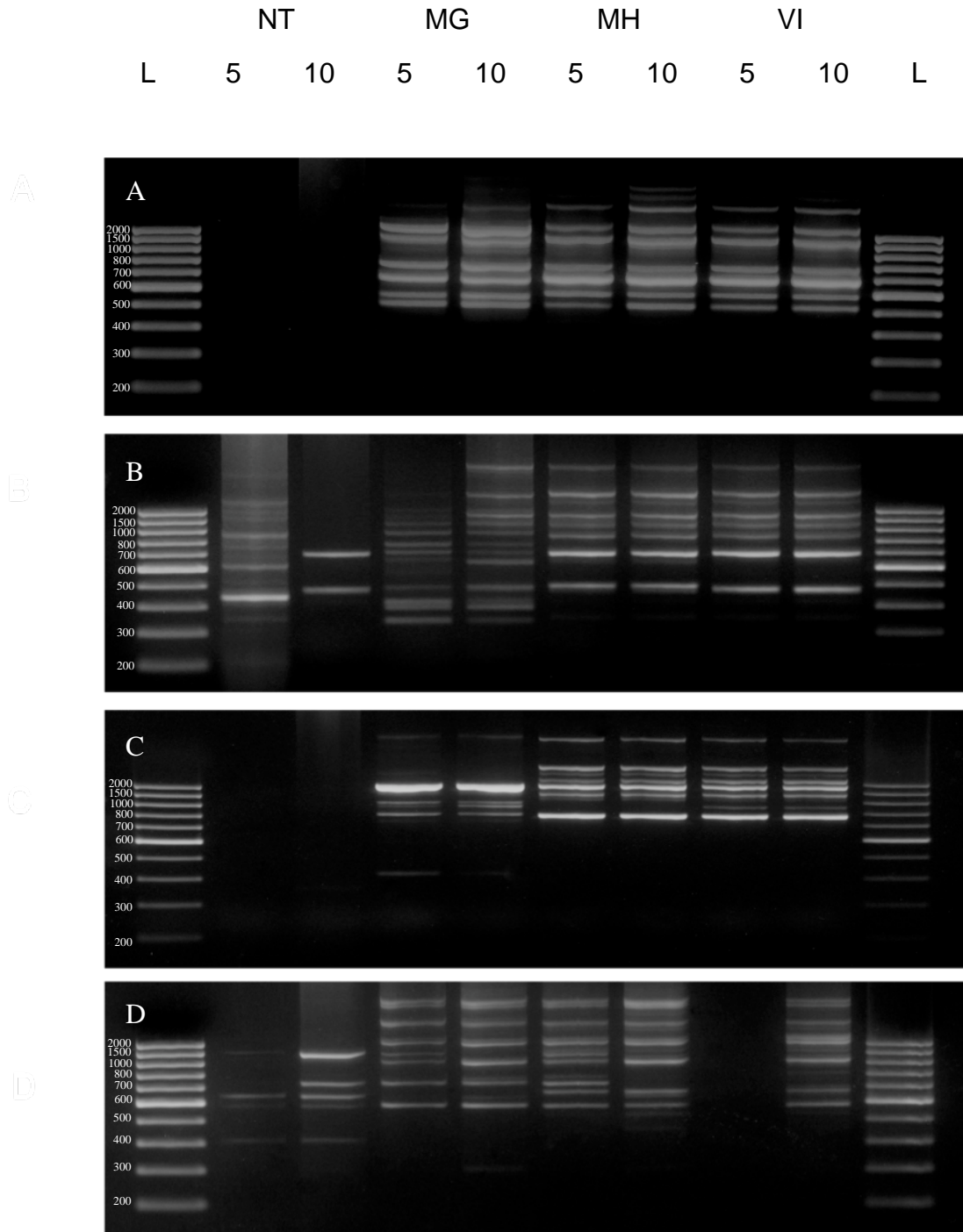


Figura 21 - Padrão de amplificação em quatro amostras de DNA de *Petiveria alliacea*, a partir de quatro diferentes regiões do Rio de Janeiro, usando diferentes iniciadores.



Legenda: A - iniciador 87; B - iniciador 88; C - iniciador 61; D - iniciador 55.
Cada amostra foi avaliada com duas concentrações de DNA (5 e 10ng). L= Marcador de peso molecular (Ladder 200bp).

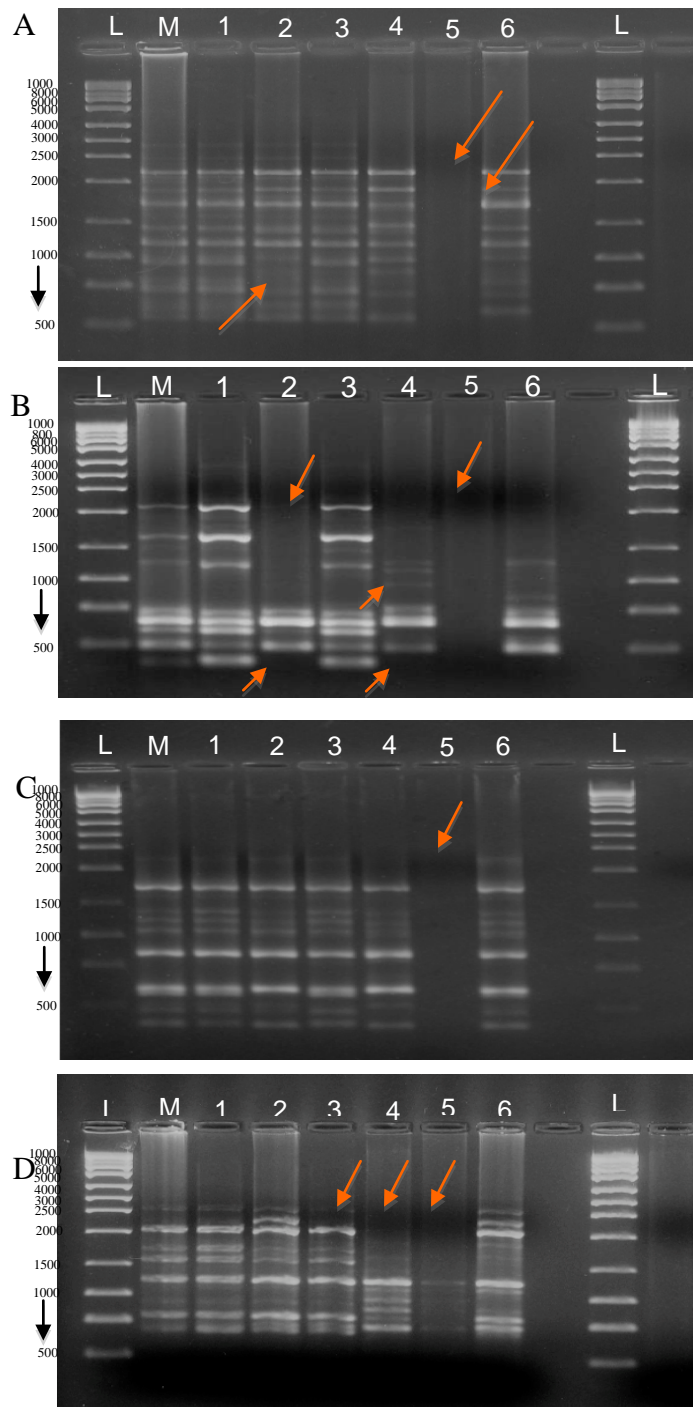
Tabela 5 – Número de bandas obtidas por RAPD nas amostras de populações de campo de *P. alliacea*.

Iniciadores	NT	MH	VI	MG
5	-	6	5	-
18	-	6	7	-
21	-	6	-	-
35	-	3	6	-
43	-	2	-	6
44	6	2	-	5
45	6	3	3	3
48	6	3	-	5
49	10	2	2	3
51	10	-	-	-
53	6	3	-	2
54	6	3	-	7
55	8	-	-	-
58	6	-	-	-
59	11	-	-	-
60	7	-	-	-
61	7	-	-	-
64	7	-	-	7
65	-	1	-	8
69	7	-	-	1
70	6	-	-	4
73	7	-	-	1
74	-	-	6	1
87	8	-	-	11
88	10	-	-	-
89	9	-	-	5
Total	281			

Quadro 4 – Número de bandas obtidas por iniciador utilizado nas ampliações RAPD nas amostras de plantas *in vitro* de *Petiveria alliacea* L. derivadas de diferentes populações.

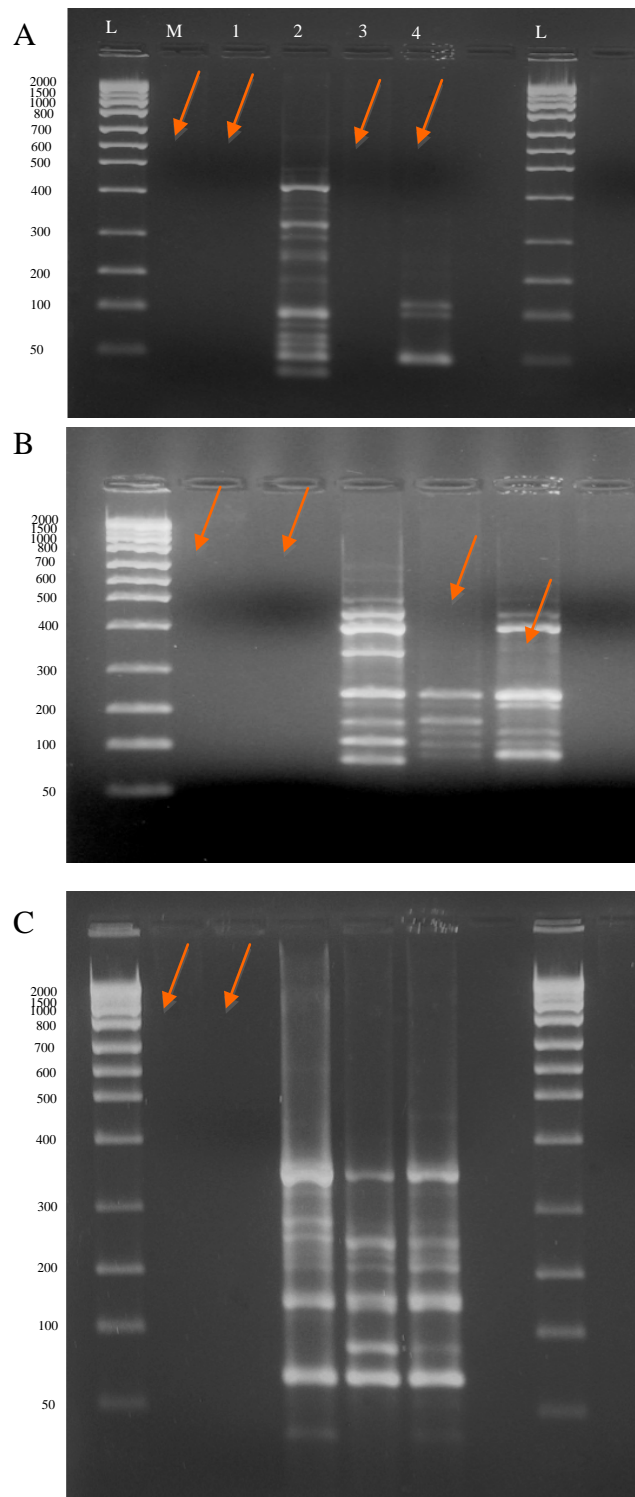
Iniciadores	Amostras				Iniciadores	Amostras				Iniciadores	Amostras			
	VI	MH	MG	NT		VI	MH	MG	NT		VI	MH	MG	NT
1	6	5	4	4	31	4	4	4	8	61	10	6	7	5
2	3	2	2	3	32	4	6	-	4	62	5	6	4	4
3	1	2	3	5	33	2	3	-	-	63	6	5	4	3
4	6	3	5	13	34	6	5	-	2	64	10	5	6	-
5	6	6	4	5	35	5	5	4	6	65	10	6	4	3
6	5	5	4	5	36	6	3	-	5	66	3	4	2	2
7	1	3	7	-	37	3	5	3	3	67	7	5	-	2
8	7	6	3	-	38	6	6	-	-	68	12	9	8	1
9	10	9	7	6	39	7	5	4	6	69	11	6	5	3
10	6	4	5	-	40	6	1	-	-	70	6	7	3	2
11	2	7	4	6	41	14	2	-	-	71	8	5	1	5
12	1	6	5	1	42	9	4	2	-	72	14	6	5	4
13	2	4	2	3	43	11	4	-	-	73	8	6	3	4
14	8	4	6	3	44	7	3	2	1	74	8	6	5	4
15	3	1	3	1	45	15	5	5	3	75	8	6	5	3
16	5	4	5	3	46	11	5	-	1	76	12	5	6	3
17	1	1	-	1	47	8	5	-	5	77	12	6	7	5
18	4	7	6	5	48	4	3	-	3	78	10	6	6	4
19	1	2	1	-	49	12	5	4	3	79	11	7	5	3
20	3	5	4	2	50	5	3	2	3	80	10	8	6	4
21	5	6	6	3	51	10	3	1	4	81	-	2	-	-
22	2	1	-	-	52	8	5	1	4	82	-	-	-	-
23	7	6	5	7	53	10	7	4	3	83	-	-	-	-
24	-	-	-	-	54	9	5	2	3	84	-	-	-	-
25	6	5	3	5	55	11	7	5	4	85	-	-	-	-
26	7	6	-	2	56	5	3	2	3	86	-	-	-	-
27	5	-	-	-	57	9	2	4	2	87	7	7	7	4
28	5	3	2	7	58	7	5	5	4	88	7	5	9	3
29	4	3	1	5	59	9	-	-	5	89	9	8	8	3
30	3	1	2	4	60	9	-	4	2					

Figura 22 - Padrão de amplificação com diferentes iniciadores de clones da amostra VI produzidos em resposta a BAP.



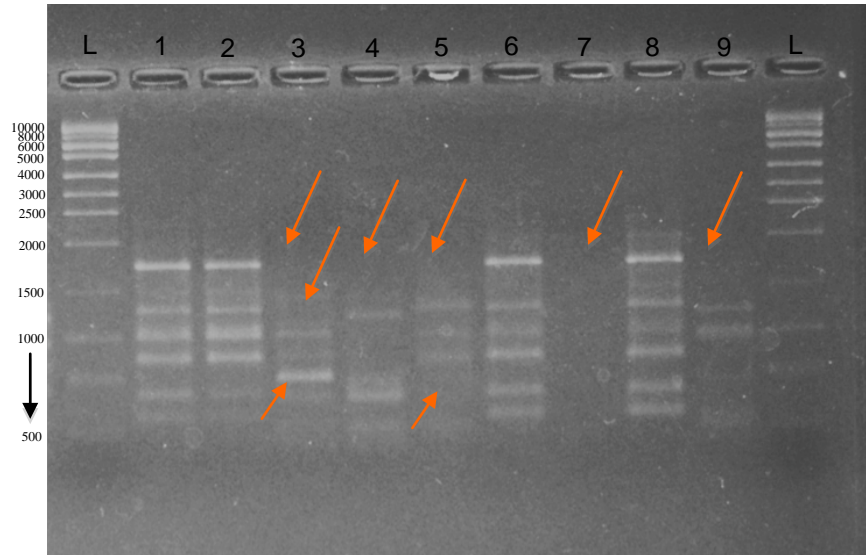
Legenda: A - iniciador 59; B - iniciador 89; C - iniciador 68; D - iniciador 49. L= Marcador de peso molecular (Ladder 1 kp), M (Matriz).

Figura 23: Padrão de amplificação da amostra de NT multiplicada usando o fitoregulador BAP com diferentes iniciadores.



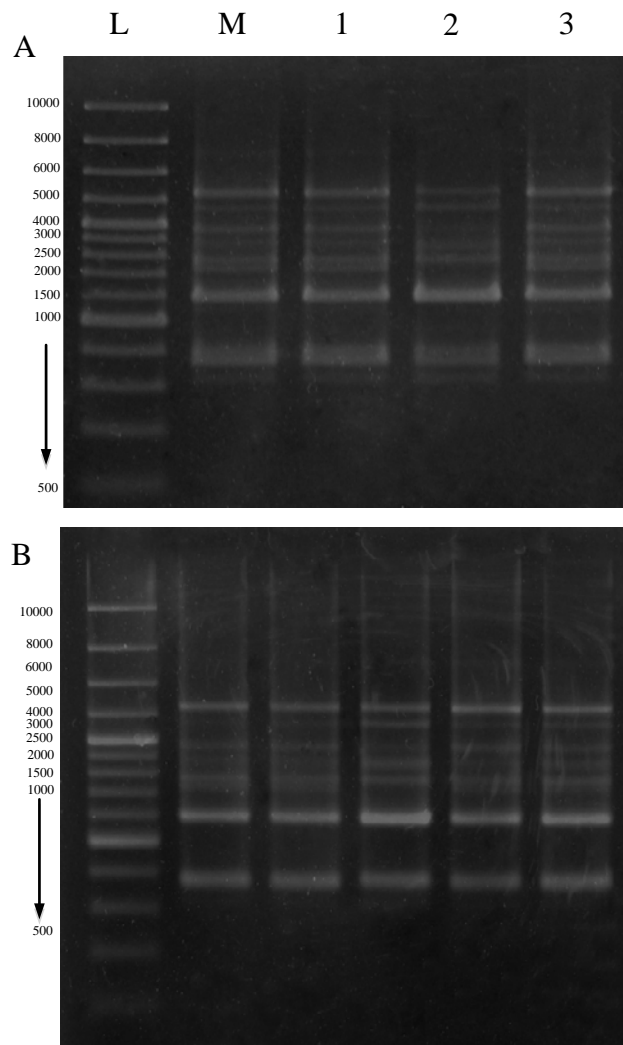
Legenda: A - iniciador 49; B - iniciador 89; C - iniciador 88. L= Marcador de peso molecular (Ladder 1 kp), M (Matriz).

Figura 24 - Padrão de amplificação de clones da plantas da população de NT originadas de plantas convertidas a partir de embriões somáticos após criopreservados pela técnica de vitrificação.



Legenda: Colunas de 1 a 5 – PVS2 em 15 min e colunas 6 a 9 – 30 min, iniciadores 23; L= Marcador de peso molecular (Ladder 1 kp).

Figura 25 - Padrão de amplificação de plantas vindas de ESFMG e ESFVI obtidos a partir de meio MS suplementado com PIC 20 μM .



Legenda: A - iniciador 88 aplicado em plantas vindas de ESFMG; B - iniciador 88 aplicado em plantas vindas de ESFVI. L= Marcador de peso molecular (Ladder 1 kp), M (Matriz).

4.5 Análise do perfil fitoquímico e monitoramento de polissulfetos

A análise fitoquímica foi dividida em 4 etapas em função da metodologia e objetivo. O perfil fitoquímico, estudado no início do trabalho, não permitiu a determinação de polissulfetos, o que direcionou o projeto para o monitoramento dessas substâncias em comparação aos padrões comerciais disponíveis (Quadro 5).

ETAPA 1

Trabalhos anteriores indicaram que os extratos etanólico e de acetato de etila eram os mais adequados para a detecção de maior diversidade química em *Petiveria alliacea*. Portanto, neste trabalho, estes extratos foram utilizados para a análise fitoquímica da espécie, utilizando as diferentes amostras estudadas (Quadro 5 – etapa 1). A separação por cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) permitiu determinar alta diversidade fitoquímica das plantas de campo e *in vitro* das diferentes populações (Tabela 6 e 7), como podem ser visualizados nos perfis cromatográficos das populações NT e MG (campo e *in vitro*) (Figuras 26 e 27A e B) e VI (*in vitro*) (Figura 28B). Os testes também foram realizados com as populações MH (campo e *in vitro*), mas por motivos técnicos os perfis não foram mostrados.

Para cada população foi realizada uma comparação entre os extratos de folhas de campo e *in vitro*. Foi possível observar o aumento significativo de alguns picos, correspondentes a substâncias, indicadas por setas vermelhas e verdes. Estes picos apresentaram tempo de retenção (t.r.) muito próximo entre as populações, porém, em alguns casos a identificação da biblioteca de espectros do cromatógrafo foi diferente. Este problema foi identificado em vários picos com t.r. entre 15,5 e 15,6, entre os quais se enquadram as substâncias majoritárias (Fitol e Esqualeno) e o polissulfeto utilizado como padrão (DTS) (Figura 29). Nestes casos, a identificação dada pela biblioteca foi diferente em todos os cromatogramas, provavelmente devido à diferença entre as amostras, e ao processo de injeção manual. Além disso, observou-se, nos diferentes cromatogramas a presença de alguns picos,

identificados por círculos, em apenas uma das amostras comparadas (Figura 27A,B,C e Figura 28B).

Nestes experimentos não foram identificados os polissulfetos pesquisados, apesar de todas as amostras terem sido avaliadas em triplicata. O problema na identificação pode ter sido causado por dificuldades técnicas para a manutenção do equipamento, na época em processo da padronização. Entretanto, a indicação de maior diversidade química foi útil para a definição dos extratos a serem preparados para avaliação com outras técnicas cromatográficas.

Quadro 5 - Determinação das substâncias separadas por CG-EM, a partir de extratos em acetato de etila, de folhas secas de campo e *in vitro* de *Petiveria alliacea*, oriundas de quatro populações naturais.

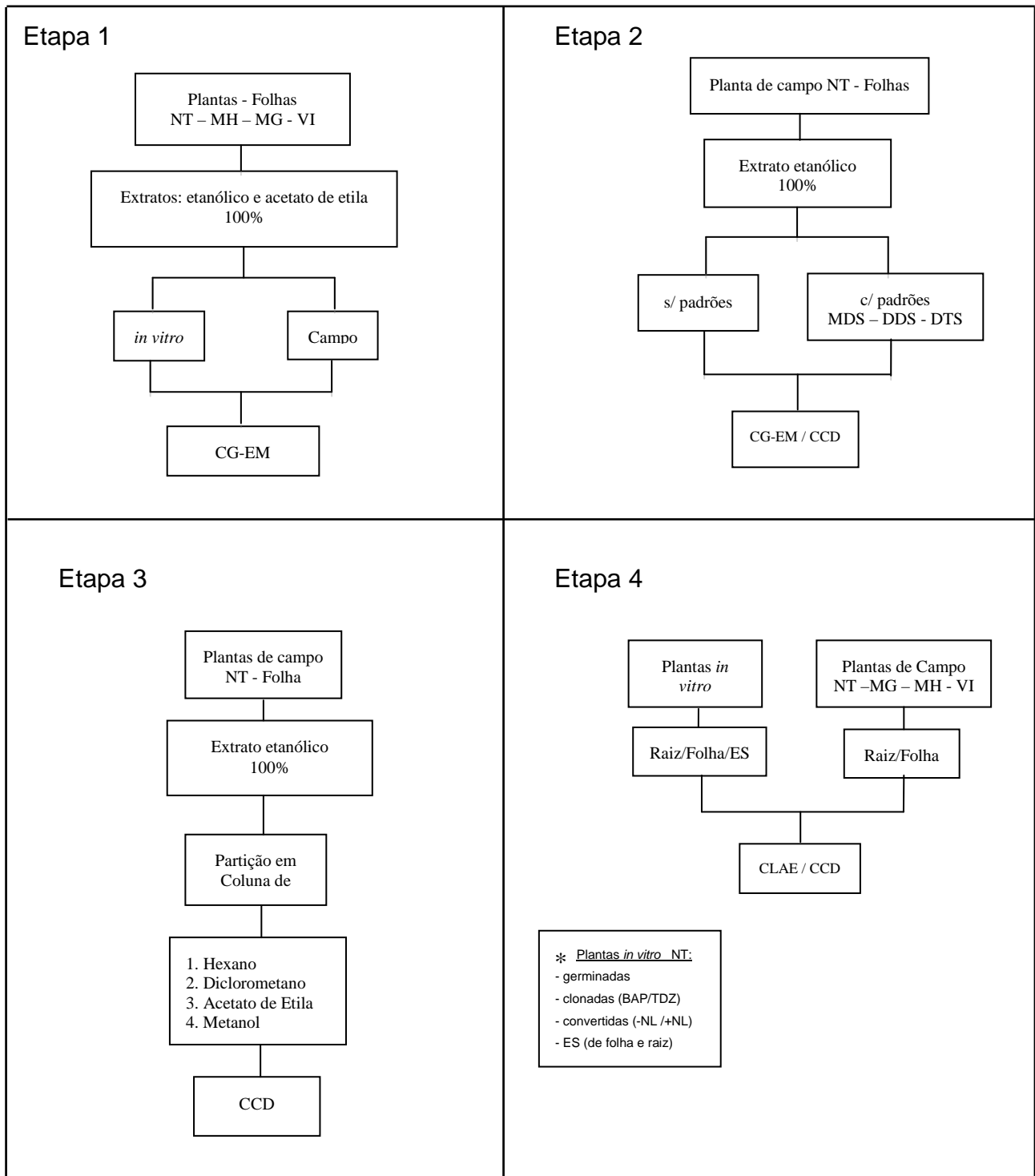


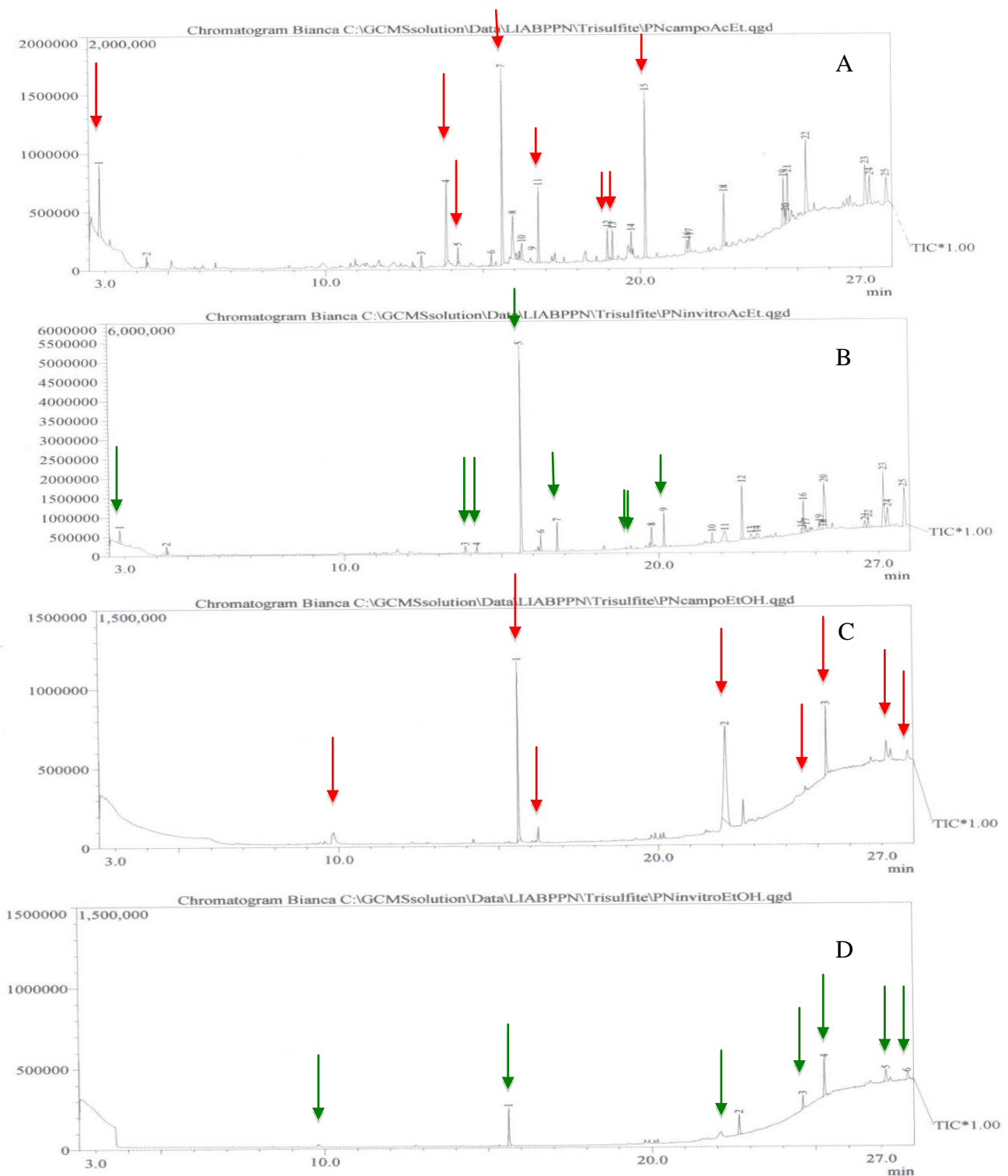
Tabela 6 - Determinação das substâncias volatilizadas e separadas por CG-EM, a partir de extratos etanólicos de folhas frescas (campo e *in vitro*) de *Petiveria alliacea* oriundas de três populações naturais.

T.R min	Composto	NT		MG		VI	
		campo	<i>in vitro</i>	campo	<i>In vitro</i>	campo	<i>In vitro</i>
2.816	Ácido Pentanóico	-	-	-	-	-	+
2.832	Propano-1,2,3-triol	+	+	+	+	-	-
2.841	Ácido Monoglicérido	+	+	-	-	-	-
3.576	Ácido butanoico	-	-	-	-	-	+
4.210	Furano	-	-	-	-	-	+
7.835	Anidrido Butírico	-	-	-	-	-	+
13.827	Ácido Tetradecanóico	-	+	-	-	-	+
13.846	Ácido Hexadecanóico	+	+	-	-	-	-
15.264	Benzaldeído	+	-	-	-	-	-
15.620	Fitol	+	+	+	+	+	+
19.771	Ácido Hexadecanóico	-	+	-	-	-	+
21.483	Ácido Octodecanóico	+	+	-	-	-	+
22.652	Esqualeno	+	+	+	-	+	+
25.276	Vitamina E	+	+	+	+	-	+
26.566	Estigmasterol	-	+	-	-	-	-
27.294	Colestanol	+	+	-	+	-	+

Tabela 7 - Determinação das substâncias volatilizadas e separadas por CG-EM, extrato de acetato de etila de folhas frescas (campo e *in vitro*) de *Petiveria alliacea* oriundas de três populações naturais.

T.R min	Composto	NT		MG		VI	
		Campo	<i>in vitro</i>	campo	<i>In vitro</i>	campo	<i>In vitro</i>
15.618	Fitol	+	+	+	+	+	+
19.902	Fenol	-	-	-	-	+	-
22.117	Vitamina E	+	-	-	+	-	-
22.656	Esqualeno	-	+	+	-	+	+
25.271	Vitamina E	-	+	+	+	+	+
26.560	Stigmasterol	-	-	+	+	-	-

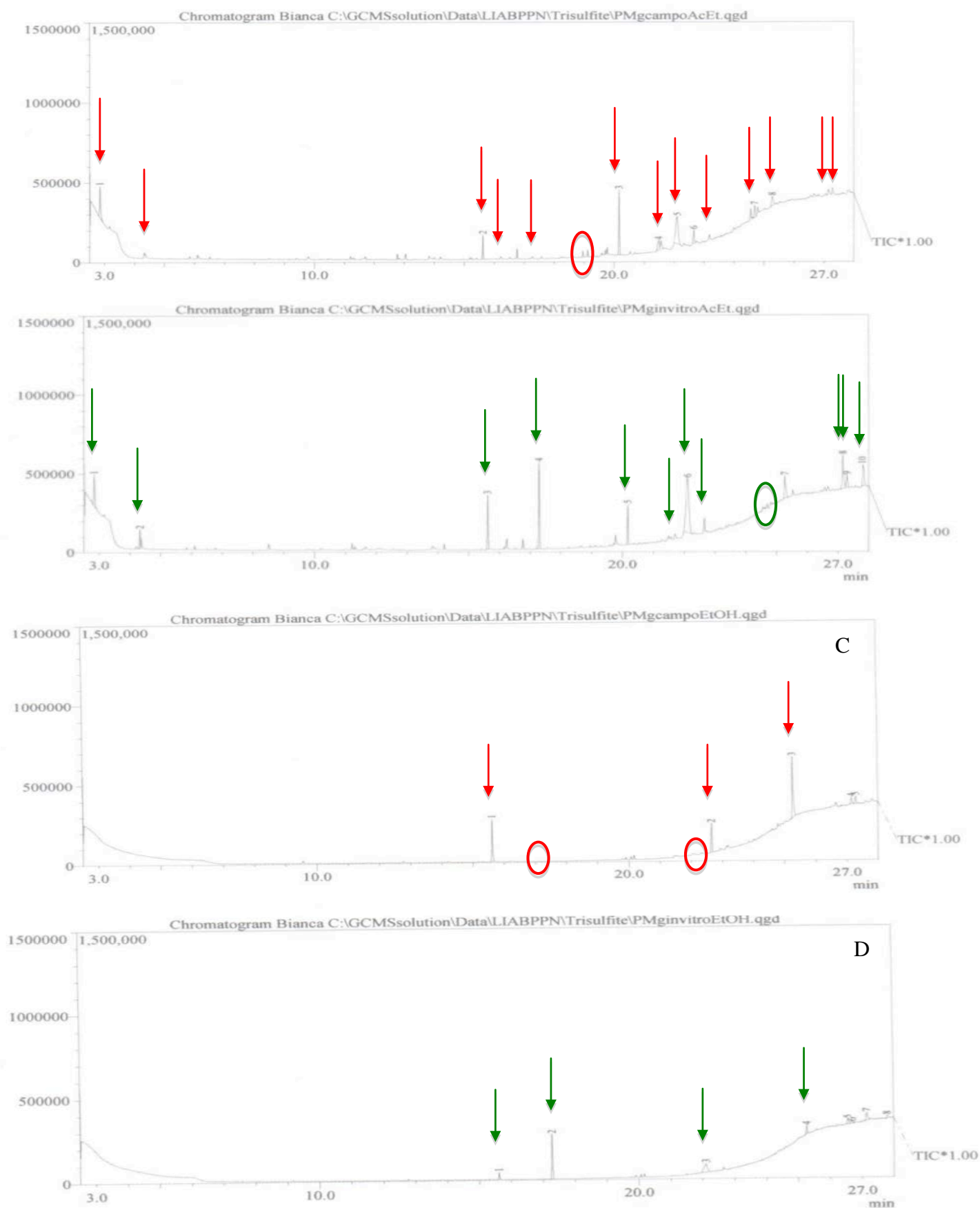
Figura 26 - Perfis cromatográficos obtidos por CG-EM em diferentes extratos de folhas de *P. allicea*, amostra NT.



Legenda: A) acetato de etila - campo B) acetato de etila - *in vitro* ; C) álcool etílico - campo; D) álcool etílico - *in vitro* .

Setas verdes: plantas *in vitro* ; setas vermelhas: plantas campo.

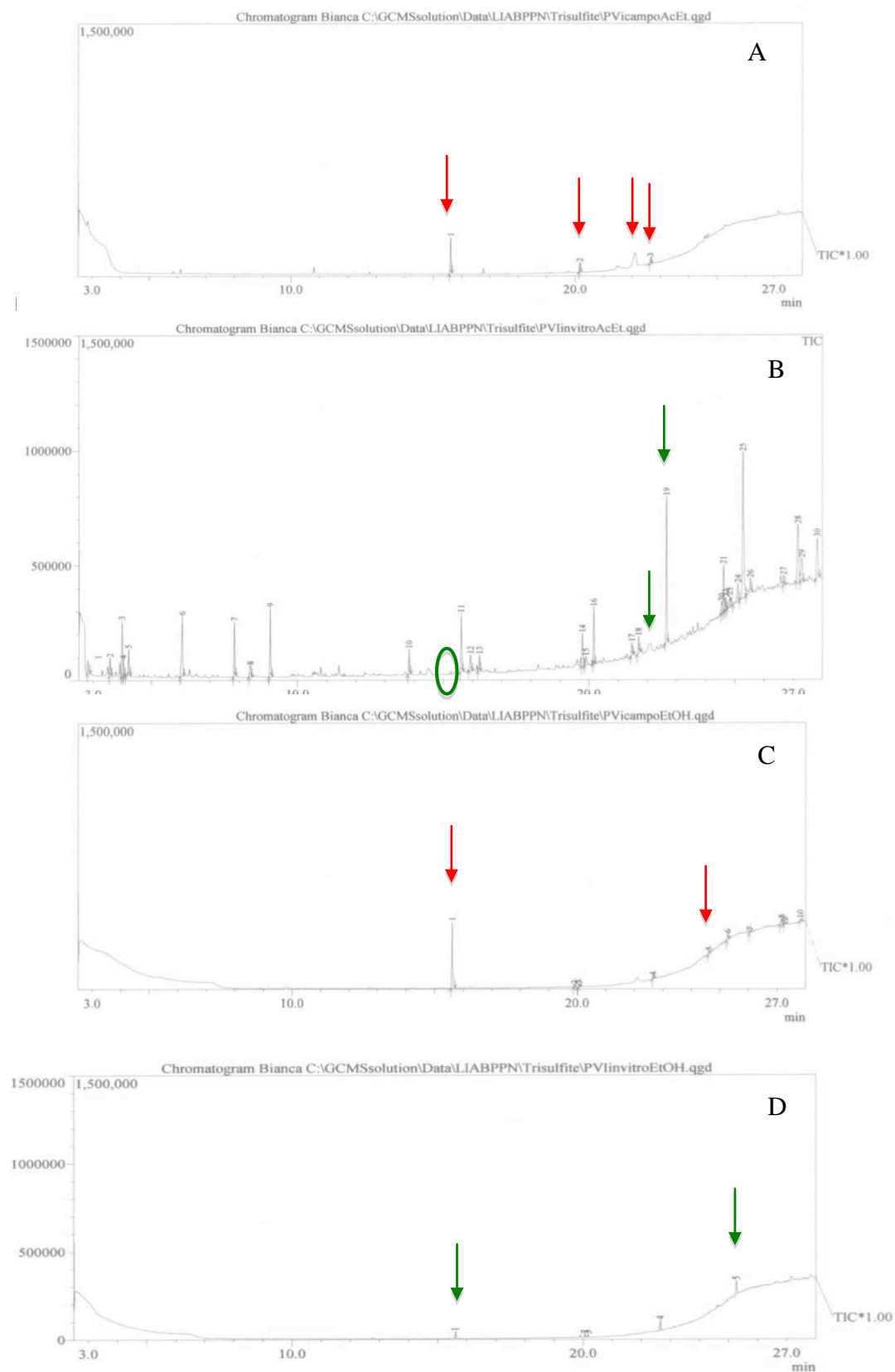
Figura 27 - Perfis cromatográficos obtidos por CG-EM, em diferentes extratos de folhas de *P. alliacea*, amostra MG.



Legenda: A) acetato de etila - campo B) acetato de etila - *in vitro* ; C) álcool etílico - campo; D) álcool etílico - *in vitro* .

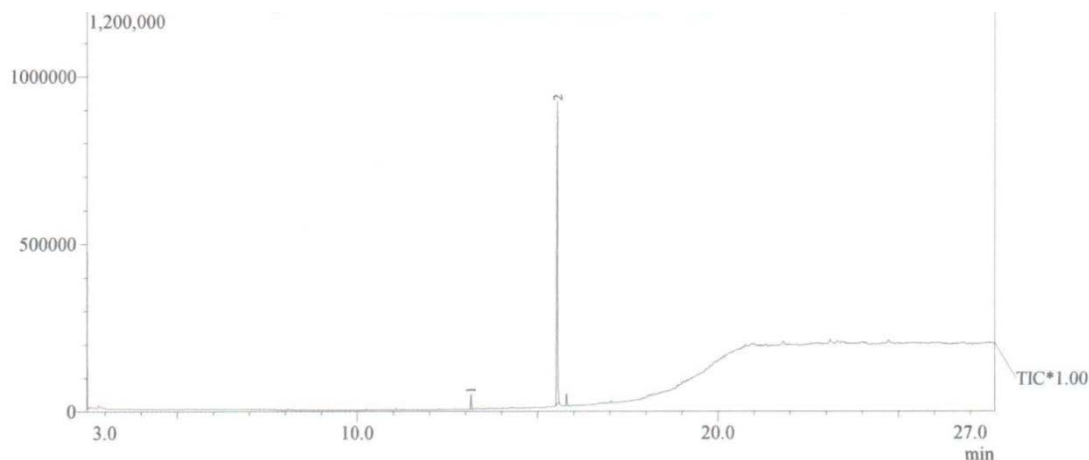
Setas verdes: plantas *in vitro* ; setas vermelhas: plantas campo, círculos: substância presente nas amostras que não foram encontradas quando comparadas.

Figura 28 - Perfis cromatográficos obtidos por CGEM, em diferentes 93 extratos de folhas de *P. allieacea*, amostra VI.



Legenda: A) acetato de etila - campo B) acetato de etila - *in vitro* ; C) álcool etílico - campo; D) álcool etílico - *in vitro* .
Setas verdes: plantas *in vitro* ; setas vermelhas: plantas campo, círculos: substância presente nas amostras que não foram encontradas quando comparadas.

Figura 29: Cromatograma do padrão do Dibenzil trissulfeto (DTS)



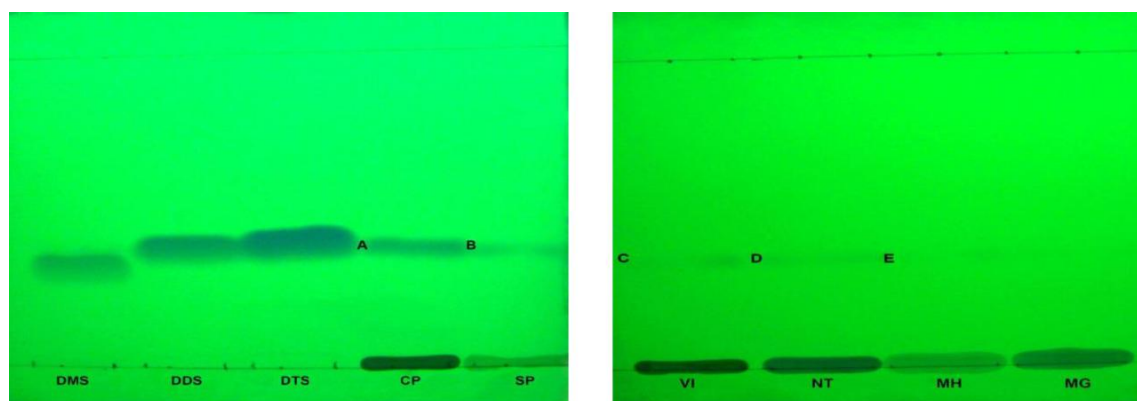
ETAPA 2

Como não foi possível a identificação dos polissulfetos nas condições do CG-EM testadas, foi incluído um tratamento de adição dos padrões nas amostras obtidas com a extração com etanol absoluto P.A. desta forma foram adicionados 100 mg dos padrões comerciais de polissulfetos (DMS – DDS – DTS) nos extratos das amostras. Além disso, foram mantidas amostras controle sem adição dos padrões (Quadro 5 – etapa 2).

O material ficou incubado por uma semana, em temperatura ambiente, sendo em seguida evaporado sobre pressão reduzida, e submetidos às técnicas de CG-EM e CCD, para detecção dos padrões nos diferentes extratos (s/padrão e c/padrão). Várias fases móveis foram testadas para a identificação dos diferentes polissulfetos por CCD (Quadro 3), a melhor condição foi em hexano:diclorometano (90:10), com visualização em 254 nm (Figura 30; Tabela 8). Apesar dos diferentes tratamentos (s/padrão e c/padrão), foi possível identificação de polissulfetos em todos os tratamentos.

Entretanto, a avaliação destes materiais pela técnica de CG-EM, não permitiu a identificação dos polissulfetos nas amostras s/padrão, apenas nas amostras tratadas com os padrões (dados não mostrados).

Figura 30 - Cromatograma em camada delgada (CCD) de extrato etanólico de plantas de campo.



Legenda: Marechal Hermes (MH), Niterói (NT), Magé (MG) e Vila Isabel (VI) e do mercado de Madureira (MB02) com padrões (C/P) e sem padrões (S/P) e visualizada em câmara UV a 254 nm.

Tabela 8 - Valores de R_f das amostras de *Petiveria alliacea* L. obtidas por CCD .

Bandas	R_f (cm)
a	0,37
b	0,37
c	0,36
d	0,36
e	0,36
f	0,32
g	0,37

ETAPA 3

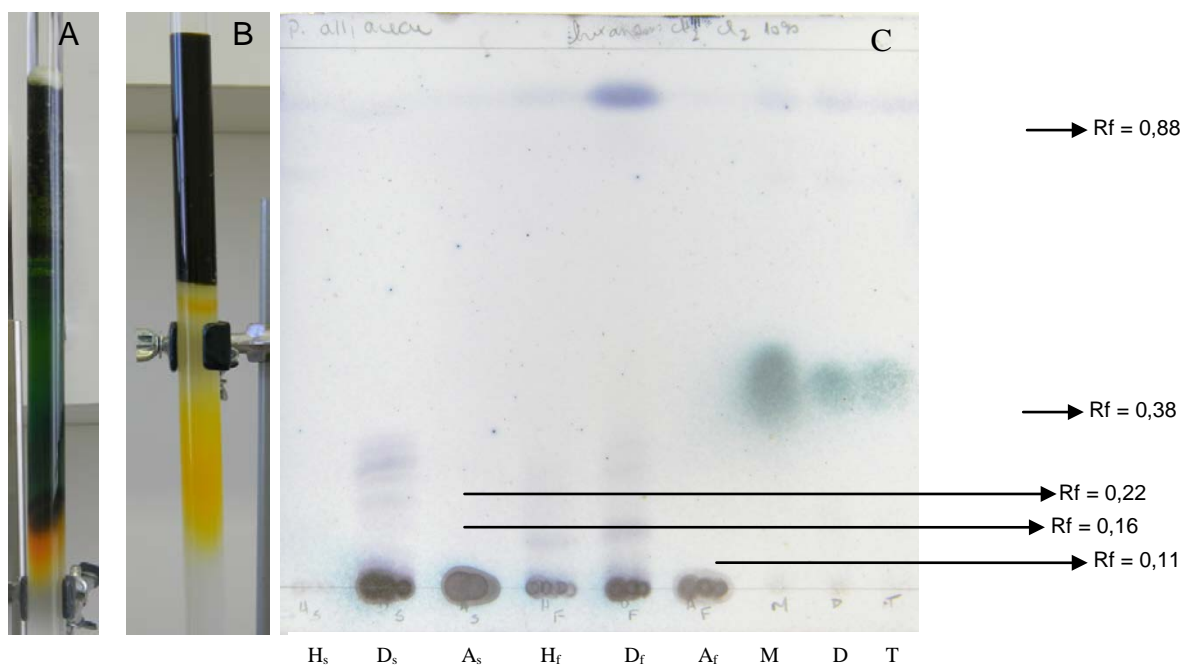
Visando aprofundar as análises da genotoxicidade, além dos estudos fitoquímicos foram preparados extratos etanólicos de folhas secas usando amostra NT de campo. Entretanto, devido às dificuldades para solubilizar o material em água deionizada, o extrato etanólico foi particionado em coluna de sílica (Figura 31A e B) com diferentes solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila), visando separar as frações mais apolares que estariam impedindo a solubilização. As frações obtidas dos extratos etanólicos de plantas de campo da população de NT não foram avaliadas pela técnica de CG-EM, somente pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) e a identificação de polissulfetos foi feita por comparação visual com os diferentes padrões comerciais utilizados (MDS, DDS e DTS) (Figura 31C).

Nas partições obtidas em diclorometano foi observada a formação de bandas, muito próximas, já nas demais partições (hexano e acetato de etila), não houve a formação de bandas. Provavelmente, o sistema de solvente utilizado, hexano:diclorometano (90:10) não foi suficiente para arrastar as substâncias ali presentes, mantendo-as no ponto de origem (Figura 31C).

No sistema de eluição selecionado para CCD (hexano:diclorometano (90:10), em 254 nm), permitiu a identificação dos compostos sulfurosos (WAGNER e BLADT, 2009; MIGUEL, 2015; SILVA, *et al.*, 2015).

Indícios da presença de compostos sulfurosos foram observados quando as cromatoplacas foram visualizados em câmara UV a 254 nm, revelando bandas correspondentes aos padrões comerciais, na comparação das amostras de campo (NT, MH, MG e VI) com adição dos padrões de polissulfetos comercializados (c/padrão), no material íntegro, sem os padrões (s/padrão) e nas amostras de campo NT, mantidas no telado do NBV (Figura 30 e Tabela 8).

Figura 31 - Cromatografia em coluna de sílica do extrato etanólico de *Petiveria alliacea*.



Legenda: A - extrato de folhas secas; B - idem utilizando folhas secas C - CCD com as frações obtidas na coluna de sílica. Hs - Hexano em folhas secas; Ds - Diclorometano em folhas secas; As - Acetato de etila em folhas secas; Hf - Hexano em folhas frescas; Df - diclorometano em folhas frescas; Af - Acetato de etila em folhas frescas; M = Dibenzil sulfeto; D = Dibenzil dissulfeto e T = Dibenzil trissulfeto.

ETAPA 4

Os extratos em álcool:água destilada 70% (v/v) analisados por CCD foram também avaliados por CLAE, para confirmar a presença dos diferentes polissulfetos (Quadro 5 – etapa 4). Todas as populações de campo (folhas e raízes) e a população de Niterói (material *in vitro*) foram analisadas. Quatro comprimentos de onda foram avaliados na CLAE: 230, 254, 300 e 340 nm, a fim de otimizar a identificação dos polissulfetos nas diferentes amostras, em comparação aos padrões comerciais. Os padrões comerciais foram detectados, tempos de retenção (DMS: 25,303 min, DDS: 26,580 min e DTS: 27,833 min), no comprimento de onda de 254 nm (Figura 32).

Em relação às amostras, nos extratos álcool:água destilada 70% (v/v), todos os polissulfetos utilizados como padrões foram identificados nas folhas das amostras de campo das diferentes populações, no comprimento de onda de 254 nm. Entretanto, nas amostras de raízes de plantas de campo das populações de MH e NT, o polissulfeto DMS não foi identificado neste comprimento de onda (Tabela 9 e Figura: 33, 34, 35, 36).

Considerando-se os outros comprimentos de onda avaliados, a 230 e 254 nm, todos os polissulfetos foram identificados nas folhas de campo da população NT. Nas populações VI e MH, em 230 nm, não foram identificados DMS nos extratos de folhas, nem no de raiz. DTS foi detectado nos extratos de raízes e de folhas. Na população MG nenhum polissulfeto foi identificado nos extratos de folhas em 230 e 340 nm, entretanto, DTS foi identificado nestes dois comprimentos de onda nos extratos de raízes, enquanto que na amostra MH o DDS não foi detectado em 300 e 340 nm, na população VI não foi identificado o DMS em 230 e 340 nm (Tabela 9). Deve-se ressaltar que, o DTS foi identificado em todas as amostras de raízes de campo, constituindo um bom marcador fitoquímico para o material de campo.

Em relação ao material *in vitro*, todos os extratos avaliados foram preparados a partir de folhas e raízes de embriões somáticos ou plantas multiplicadas da amostra NT. Os extratos de folhas e raízes que não sofreram nenhum tratamento hormonal (plantas oriundas de meristemas pré-existent), foram avaliados na CLAE-DAD, com a finalidade detectar os polissulfetos. Nos comprimentos de onda de 230, 300 e 340 nm nenhum dos polissulfetos foi identificado nas amostras de folha, e nem de raiz. Em 254 nm o DTS só foi identificado na amostra de folha *in vitro*. O DMS foi

identificado tanto nas amostras de folha quanto de raiz *in vitro*, já o DDS não foi encontrado em nenhuma das amostras (Tabela 9 e Figura 37).

Plantas multiplicadas (clones) em resposta a dois diferentes reguladores de crescimento, isoladamente (BAP ou TDZ), também foram avaliadas quanto à produção de polissulfetos. Nos extratos de folhas de plantas induzidas por BAP, os três diferentes tipos de polissulfetos foram identificados, nos comprimentos de onda de 254 e 300 nm. Em 230 nm somente o DTS não foi encontrado e em 340 nm somente o DTS foi encontrado. Nas amostras de raízes o DMS foi identificado a 230 e 254 nm, enquanto que o DDS somente foi detectado em 254 nm, já em 300 e 340 nm somente o DDS foi detectado. Nos extratos de folhas de plantas induzidas por TDZ, somente o polissulfeto DMS foi detectado em 230 e 254 nm. Em 300 e 340 nenhum polissulfeto foi identificado. (Tabela 9). Nas amostras de raízes o DMS e o DDS foram identificados em 230, 254 e 300 nm. Não houve identificação de polissulfetos em 340 nm nas amostras de raízes de plantas induzidas por TDZ (Figura 38 e 39). No comprimento de onda de 254 nm, o DMS aparece em todas as amostras e condições testadas, constituindo um marcador adequado ao monitoramento biossintético destes clones, em relação aos polissulfetos.

A pesquisa de polissulfetos também foi realizada por CLAE a 254 nm, em plantas convertidas a partir de embriões somáticos de raiz criopreservados. Os extratos álcool absoluto:água destilada (70% - v/v) de folhas e raízes das plantas convertidas depois do processo de criopreservação foram submetidos à CLAE, nos diferentes comprimentos de onda testados (Figura 40). DTS foi identificado nos extratos de folhas e raízes das avaliações em 300 e 340 nm (Tabela 9). Nos demais comprimentos de onda (230, 254 e 300 nm) foi identificado apenas o DMS nestas amostras (Tabela 9). Estes resultados sugerem que o DMS pode ser o marcador mais adequado para o monitoramento biossintético destes materiais, em relação aos polissulfetos.

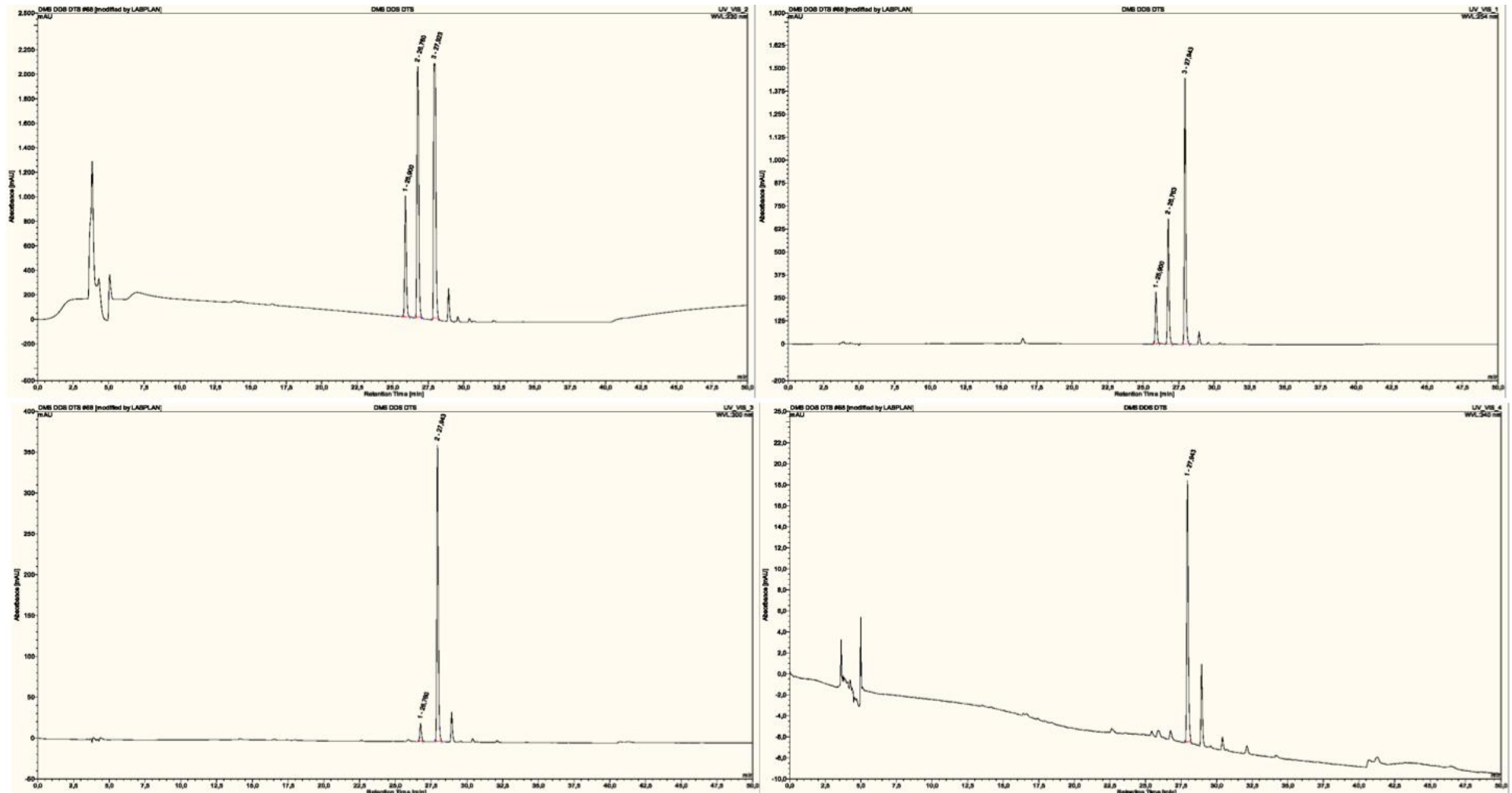
Os embriões somáticos obtidos por folhas ou por raízes foram avaliados, no extrato de álcool:água destilada 70% (v/v) de ES, somente em 254 nm os polissulfetos foram identificados. Extratos de embriões de folha apresentaram o DMS e nos extratos de embriões diferenciados a partir de raiz foram detectados DMS e DDS (Figura 41).

Em função dos resultados obtidos na CLAE utilizando-se o extrato etanólico 70%, as reações foram repetidas com os extratos em acetato de etila e álcool absoluto (100%), selecionados inicialmente (etapa 1) em função da alta diversidade química detectada no CG-EM.

Os extratos em álcool absoluto foram obtidos a partir de folhas e raízes das diferentes populações. Em todas as populações e nos diferentes extratos, em 254 nm, foram identificados os diferentes tipos de polissulfetos. Na população de VI não foi identificado o DTS, no extrato de raiz, em 340 nm. No comprimento de onda, 230 nm, no extrato de folha, não foi identificado o DTS em nenhuma das populações avaliadas, no extrato de raiz, todos os polissulfetos utilizados como padrão foram identificados (Tabela 10).

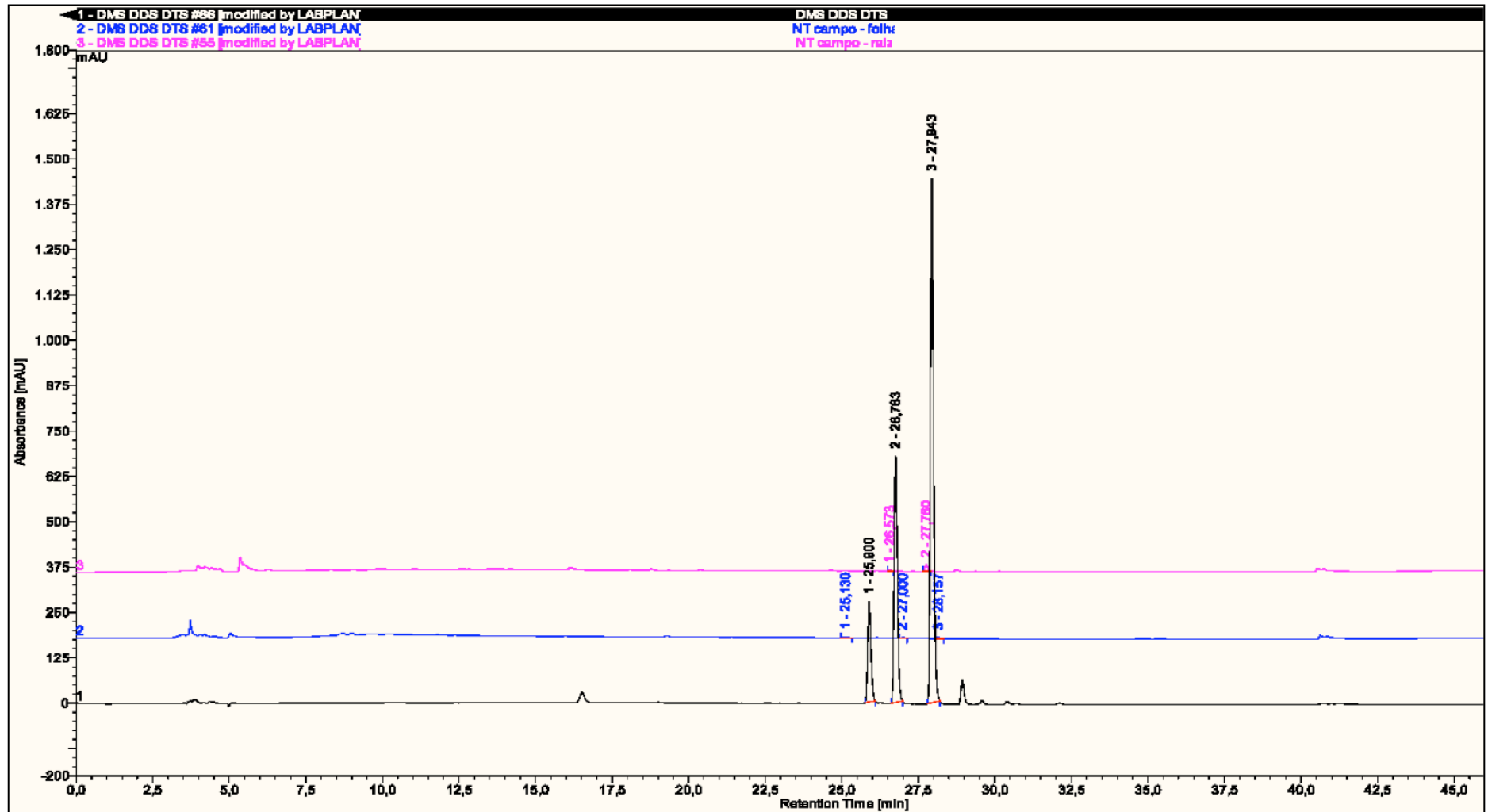
Os extratos em acetato de etila foram obtidos apenas a partir das folhas das diferentes amostras de campo. Em 230 nm todos os polissulfetos foram identificados em todas as amostras. Em 254 nm na amostra de MH só não foi identificado o DMS e em 300 nm, na mesma amostra, não foi identificado o DTS. Por fim, em 340 nm foi identificado apenas o DTS, em todas as amostras (Tabela 10 e Figuras 42, 43 44 e 45), sendo então o DTS indicado como o marcador mais indicado para o monitoramento biossintético em 300 nm, quando utilizado esse extrato.

Figura 32 - Cromatografia dos polissulfetos em diferentes comprimentos de ondas por CLAE.



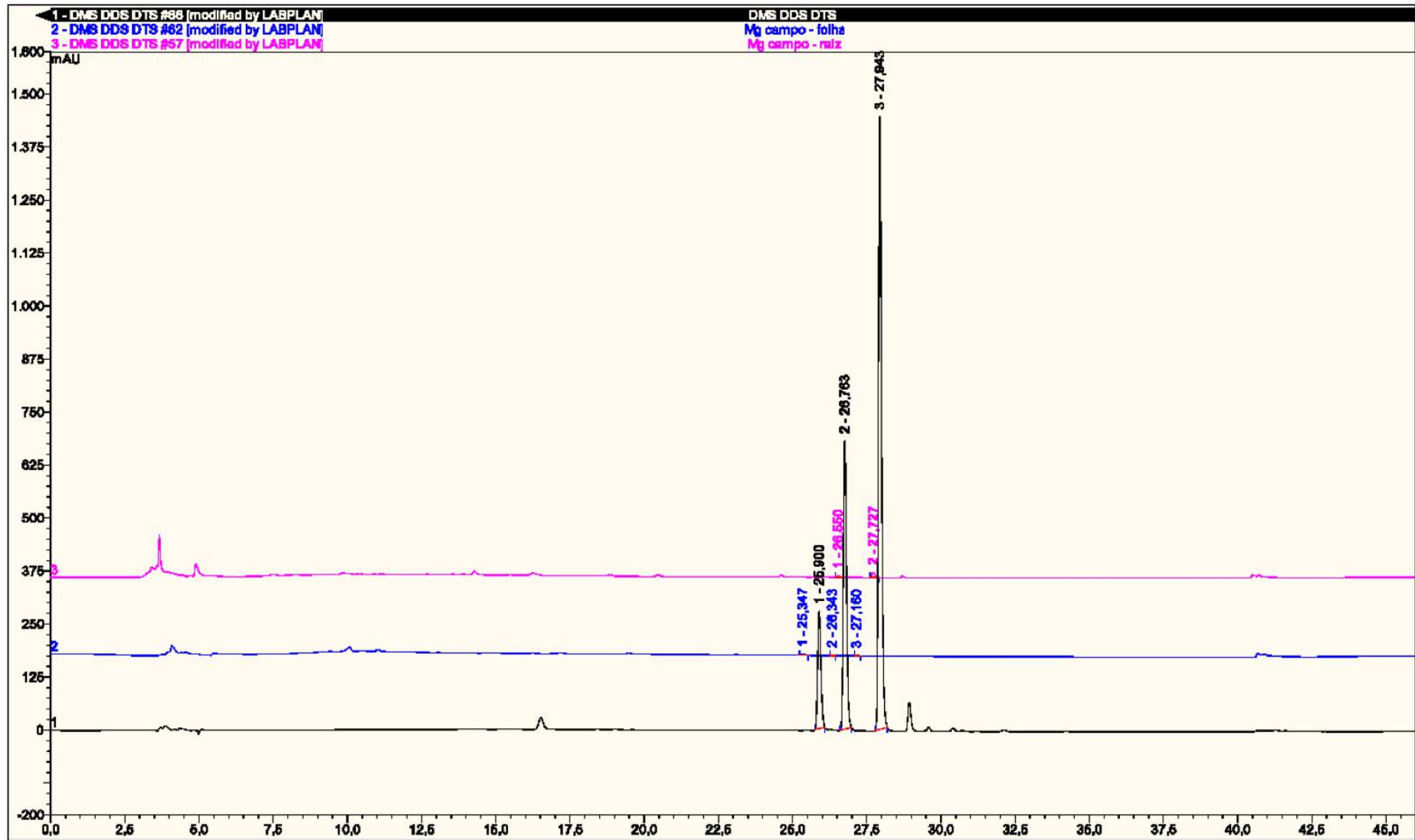
Legenda: A - 230 nm; B - 254 nm; C - 300 nm e D - 340 nm. Tempo de retenção: DMS (A e B: 25,900); DDS (A e C - 26,760; B - 26,763) DTS (B, C e D - 24,943 e A - 27,923).

Figura 33 - Cromatografia da população de NT, extrato álcool absoluto:água destilada (70% - v/v) de folhas e raízes de campo.



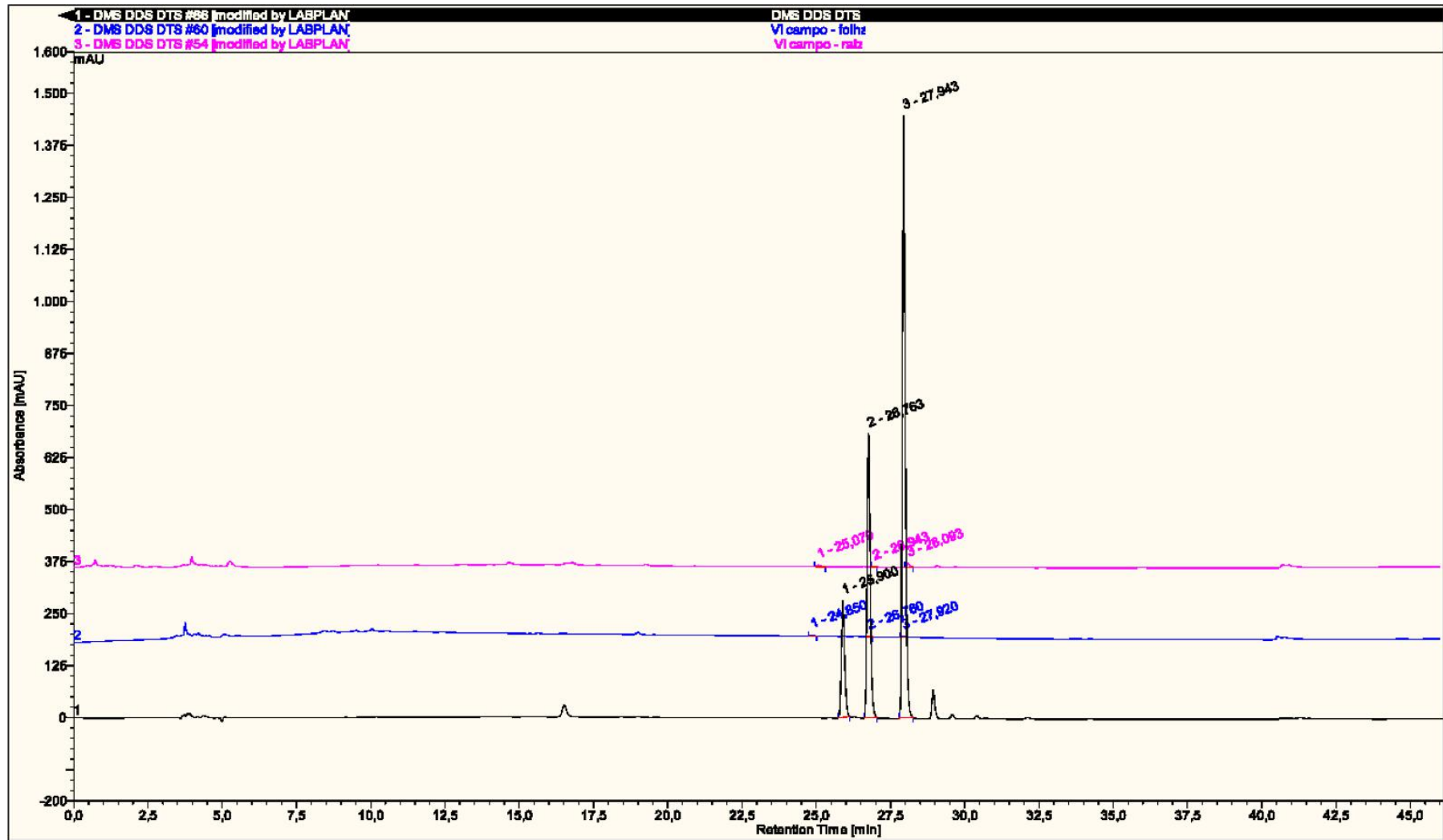
Legenda: Extrato de folha (linha azul) e de raiz (linha rosa), os padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R: 25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

Figura 34 - Cromatograma da amostra de MG, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de folhas e raízes de campo.



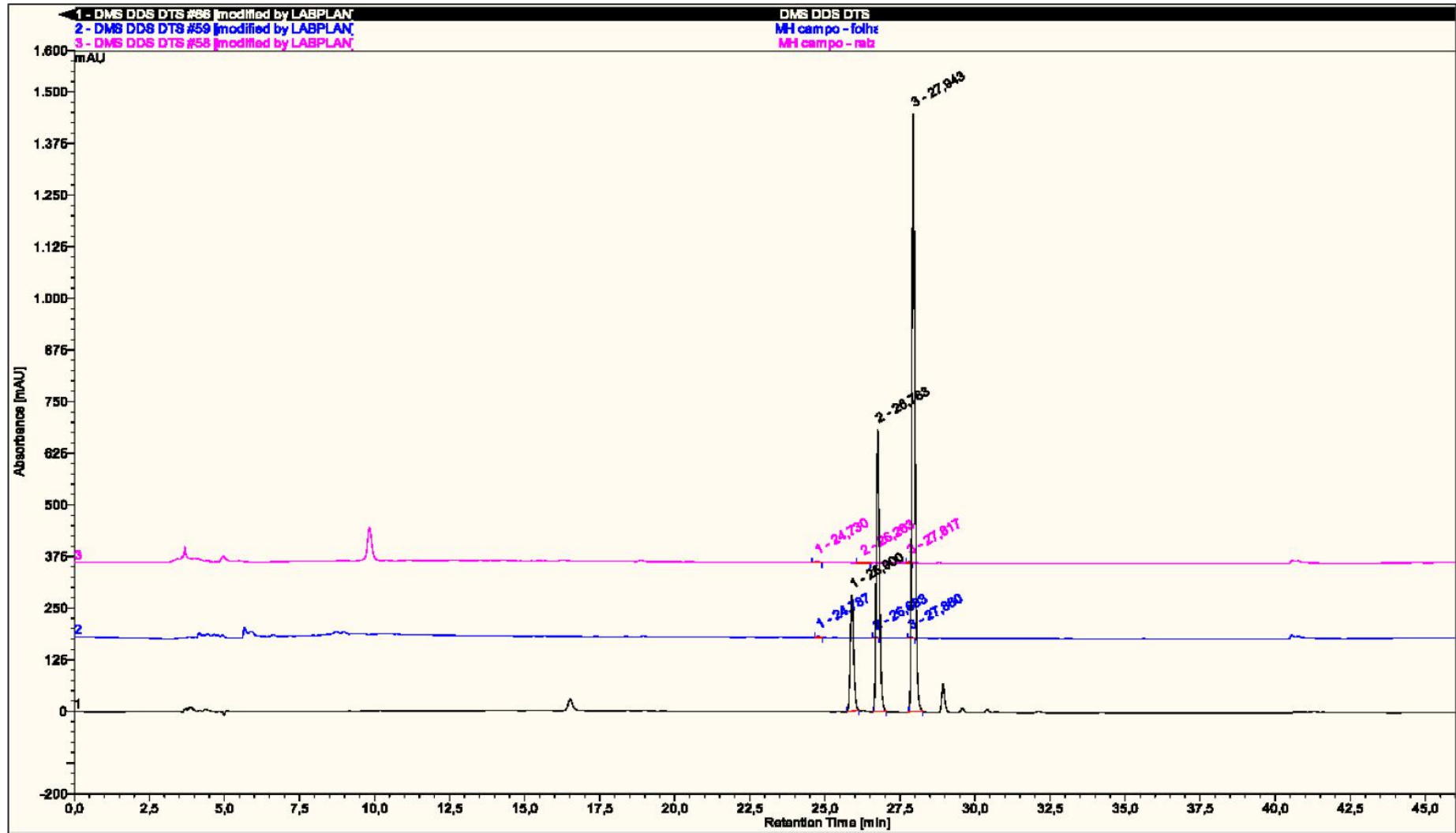
Legenda: Extrato de folha (linha azul) e de raiz (linha rosa), padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R.:25.900); DDS (T.R.: 28.783) e DTS (T.R.: 27.943).

Figura 35 - Cromatograma da amostra de VI, extrato extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de folhas e raízes de campo.



Legenda: Extrato de folha (linha azul) e de raiz (linha rosa), padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R:25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

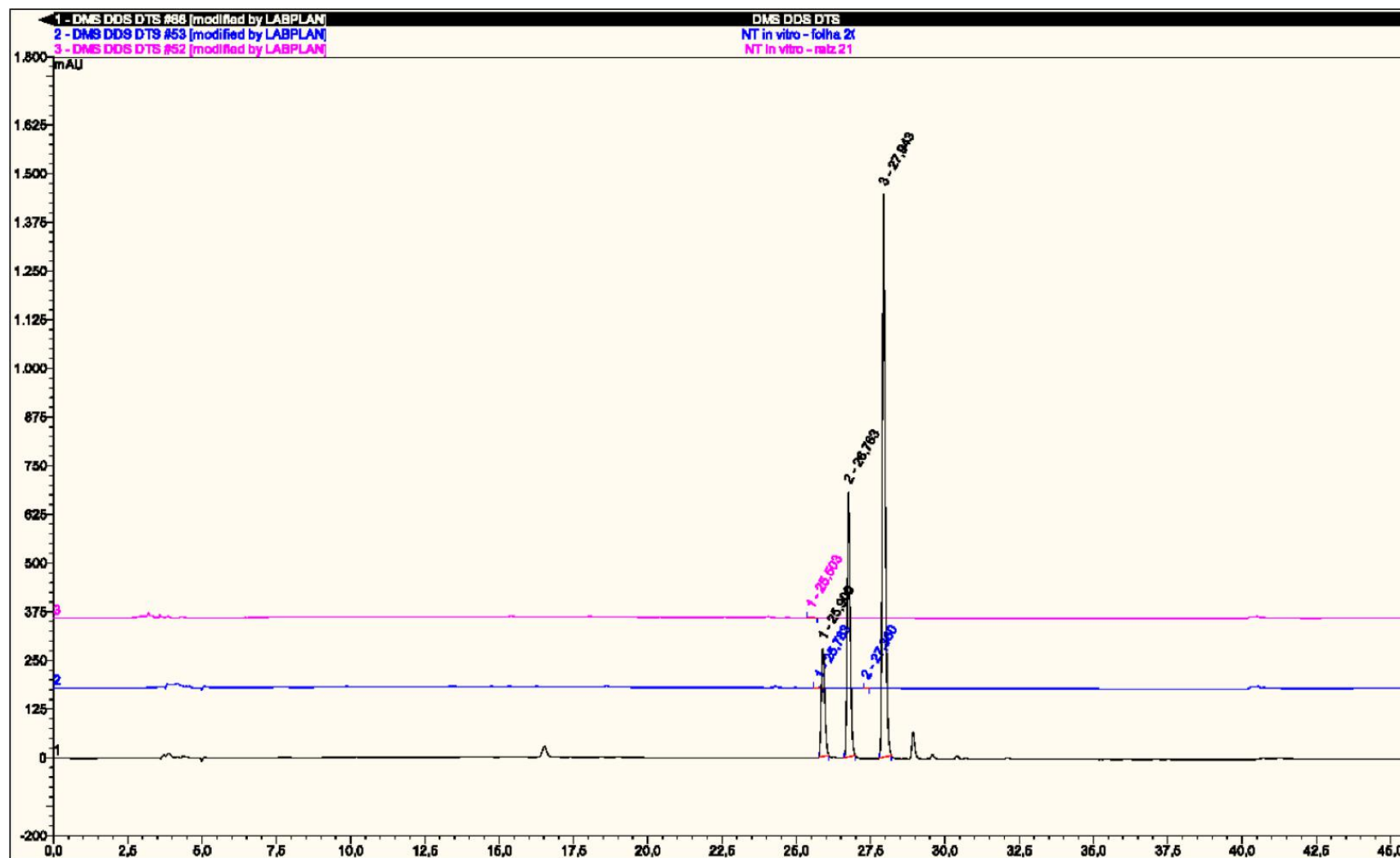
Figura 36 - Cromatograma da amostra de MH extrato álcool absoluto: água destilada (70%-v/v) de folhas e raízes de campo.



Legenda: Extrato de folha (linha azul) e de raiz (linha rosa), padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R:25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

Tabela 9 - Identificação de polissulfetos em extratos (álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de diferentes materiais de quatro populações de *Petiveria alliacea* L. em diferentes comprimentos de onda.

Amostras /tratamento	Estrutura vegetal	Comprimento de onda (nm)												
		230			254			300			340			
		DMS	DDS	DTS	DMS	DDS	DTS	DMS	DDS	DTS	DMS	DDS	DTS	
Campo	MG	Folha	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		Raiz	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	NT	Folha	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	
		Raiz	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
	VI	Folha	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
		Raiz	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	MH	Folha	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
		Raiz	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
	<i>in vitro</i>	Folha	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
		Raiz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	BAP	Folha	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
		Raiz	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
TDZ	Folha	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Raiz	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
PVS 15'	NT	Raiz	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
PVS 30'	Folha	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	
	Raiz	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
ES	Folha	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Raiz	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

Figura 37 - Cromatograma da amostra de NT, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) 70%, folha e raiz *in vitro* .

Legenda: Plantas germinadas *in vitro* , sem tratamento. Extrato de folha (linha azul) e de raiz (linha rosa), padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R.:25.900); DDS (T.R.: 28.783) e DTS (T.R.: 27.943).

Figura 38 - Cromatograma da população NT multiplicadas com BAP, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v), folha e raiz *in vitro* .

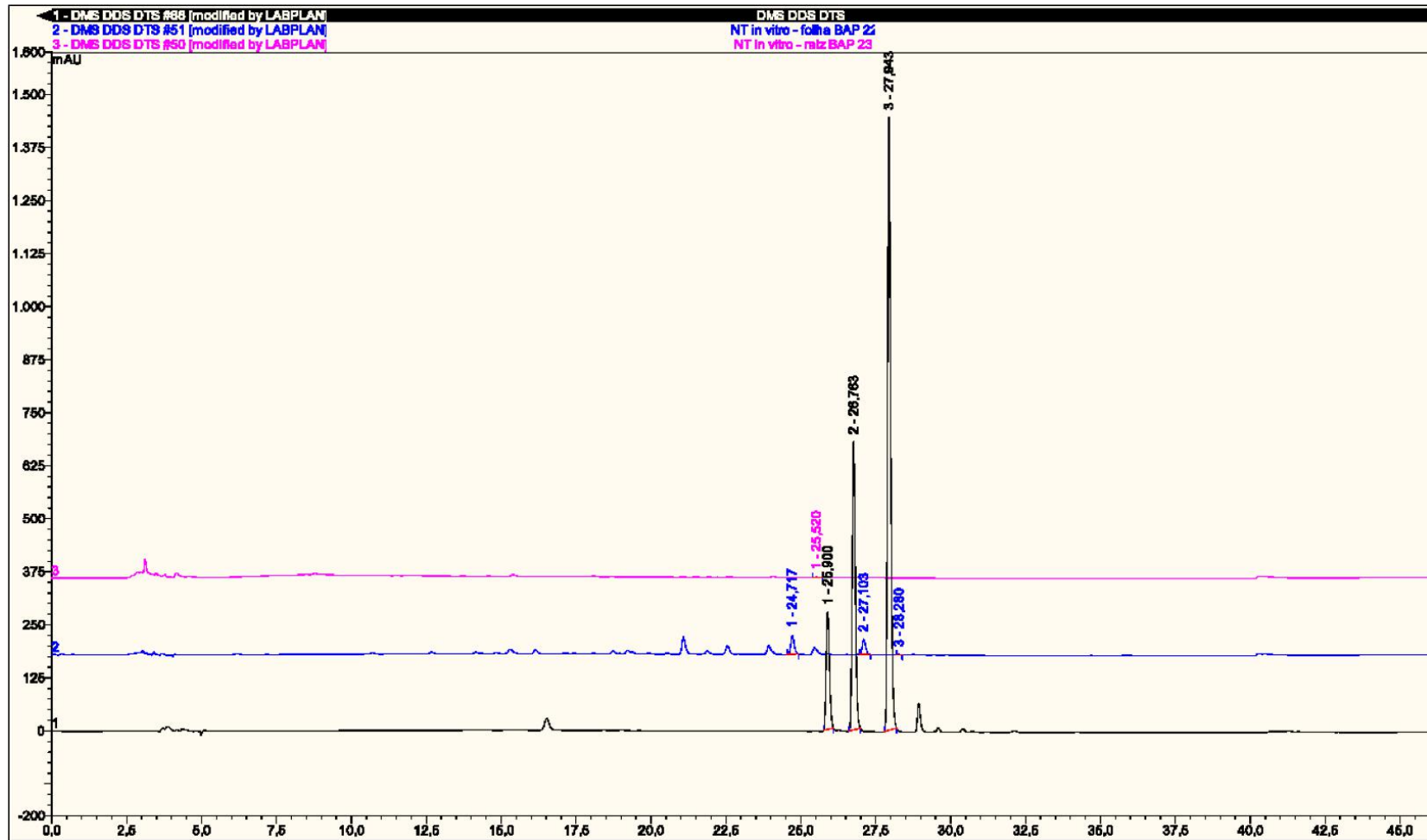
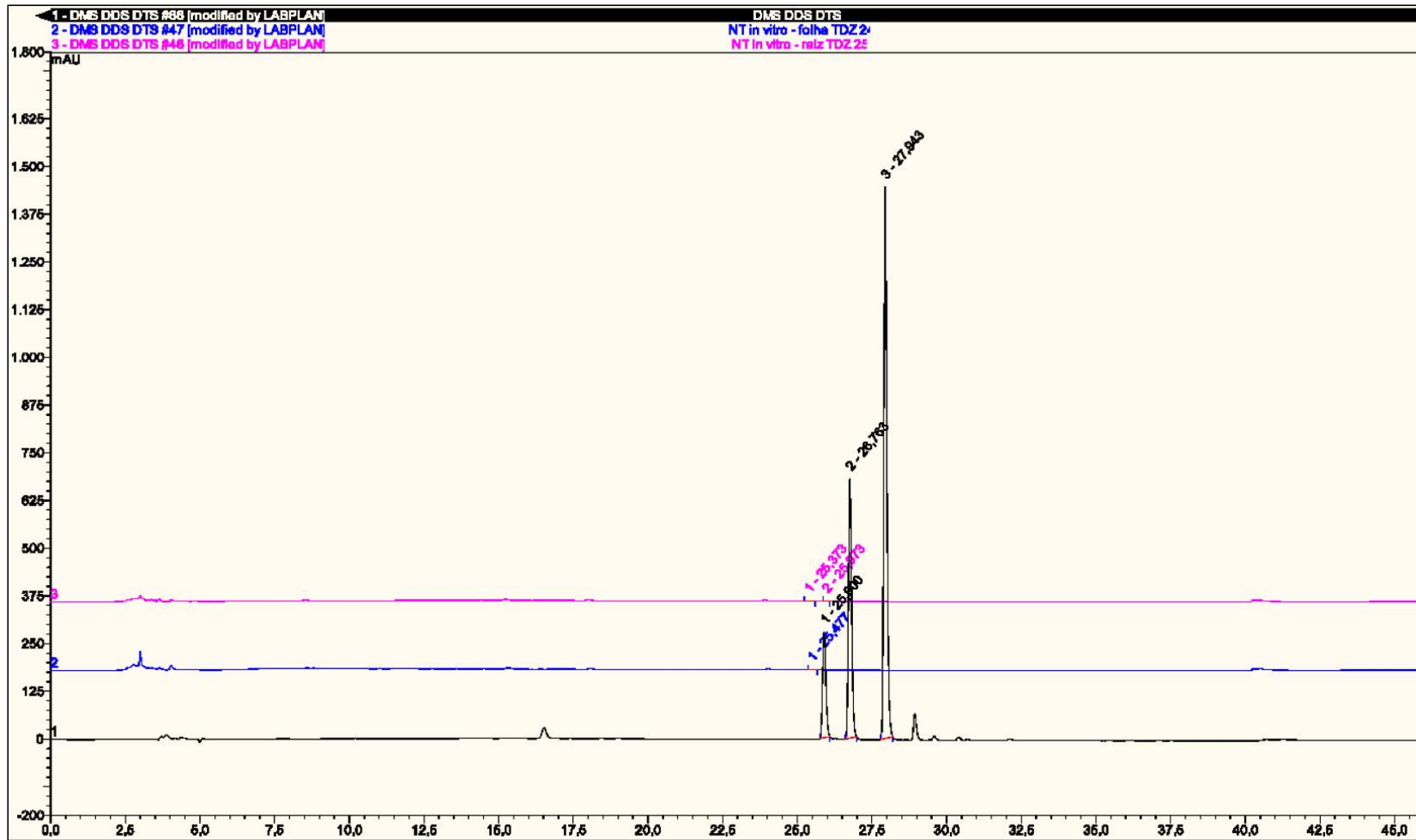
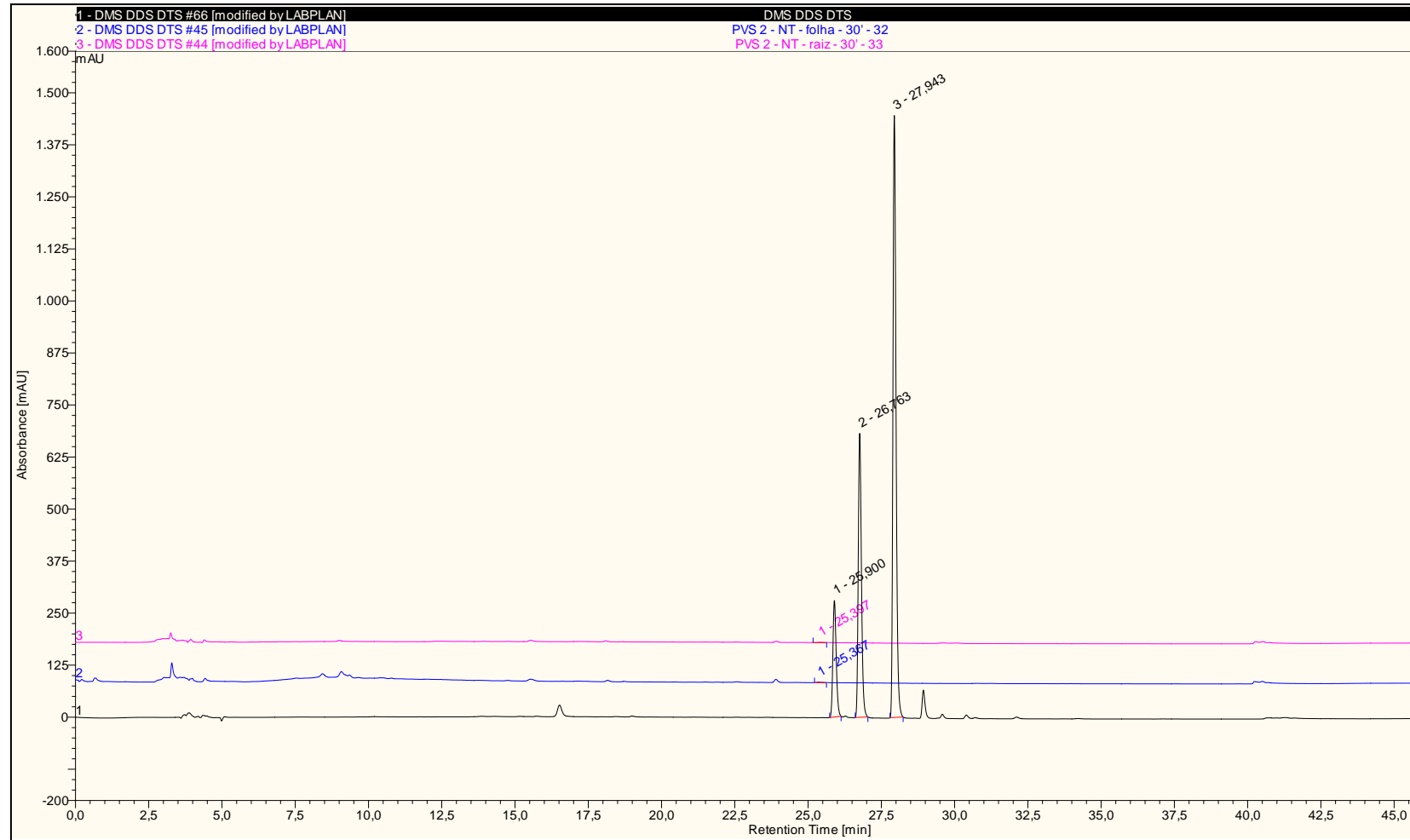


Figura 39 - Cromatograma da população NT multiplicadas com TDZ, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) folha e raiz *in vitro* .



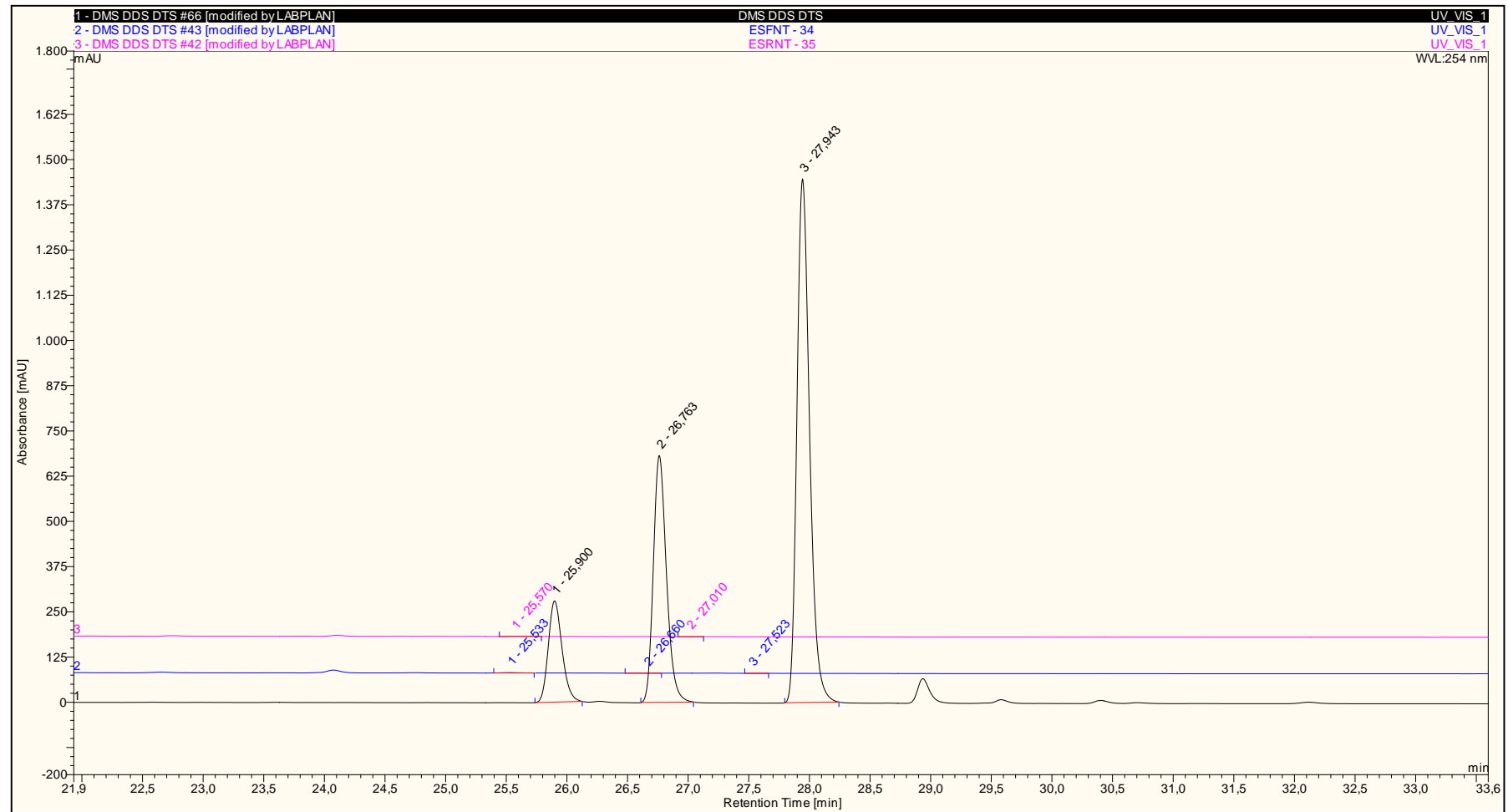
Legenda: Extrato de folha (linha azul) e de raiz (linha rosa), padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R:25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

Figura 40 - Cromatograma da população NT, extrato álcool absoluto:água destilada (70%-v/v) de plantas convertidas a partir da criopreservação de embriões somáticos em PVS2 por 30 min.



Legenda: Extrato de folha (linha azul) e de raiz (linha rosa), padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R:25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

Figura 41- Cromatograma da população NT de embriões somáticos obtidos a partir de folha e de raiz.

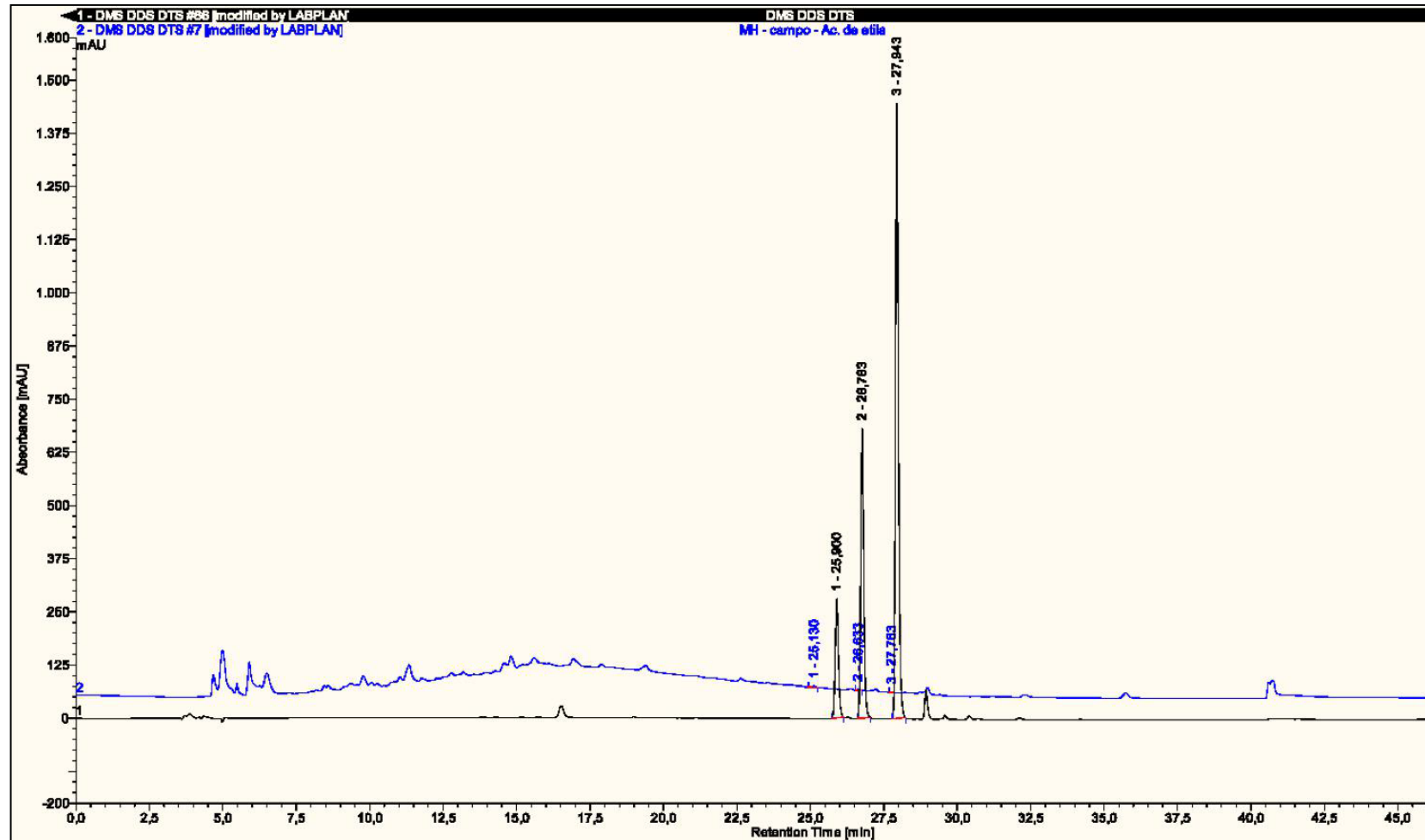


Legenda: Extrato de ESFNT (linha azul) e de ESRNT (linha rosa), padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R:25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

Tabela 10 - Identificação dos diferentes polissulfetos nas diferentes amostras de campo de *P. alliacea* em extrato de acetato de etila e álcool absoluto em diferentes comprimentos de onda.

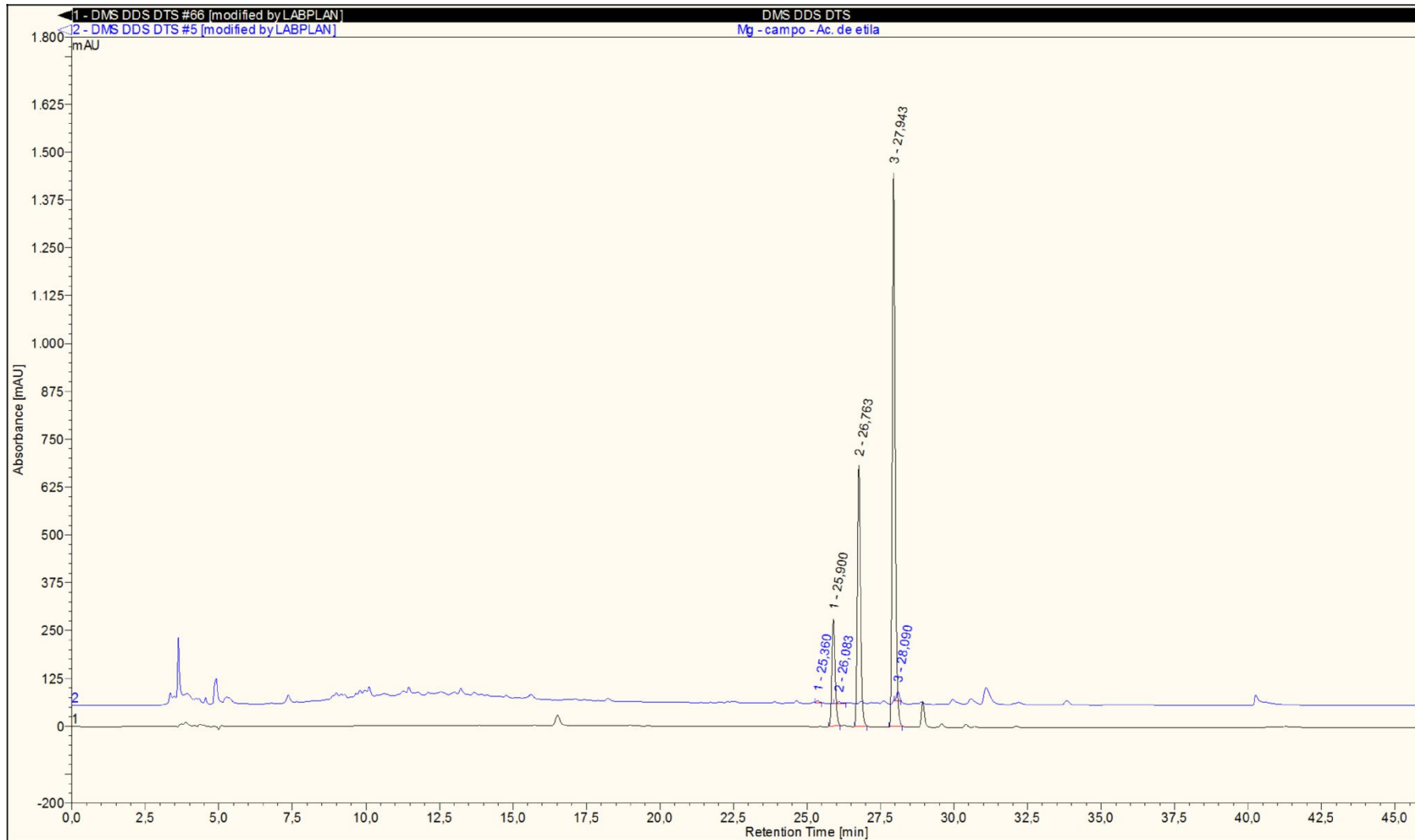
Extrato	Amostras Cod.	Estrutura vegetal	Comprimento de onda (nm)												
			230			254			300			340			
			DMS	DDS	DTS	DMS	DDS	DTS	DMS	DDS	DTS	DMS	DDS	DTS	
Acetato de Etila (100%)	MH	Folha	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
	VI		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
	MG		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	NT		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
álcool absoluto (100%)	MH	Folha	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		Raiz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	VI	Folha	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		Raiz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
	MG	Folha	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		Raiz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	NT	Folha	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		Raiz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

Figura 42 - Cromatograma da amostra de MH, extrato de acetato de etila, folha de campo.



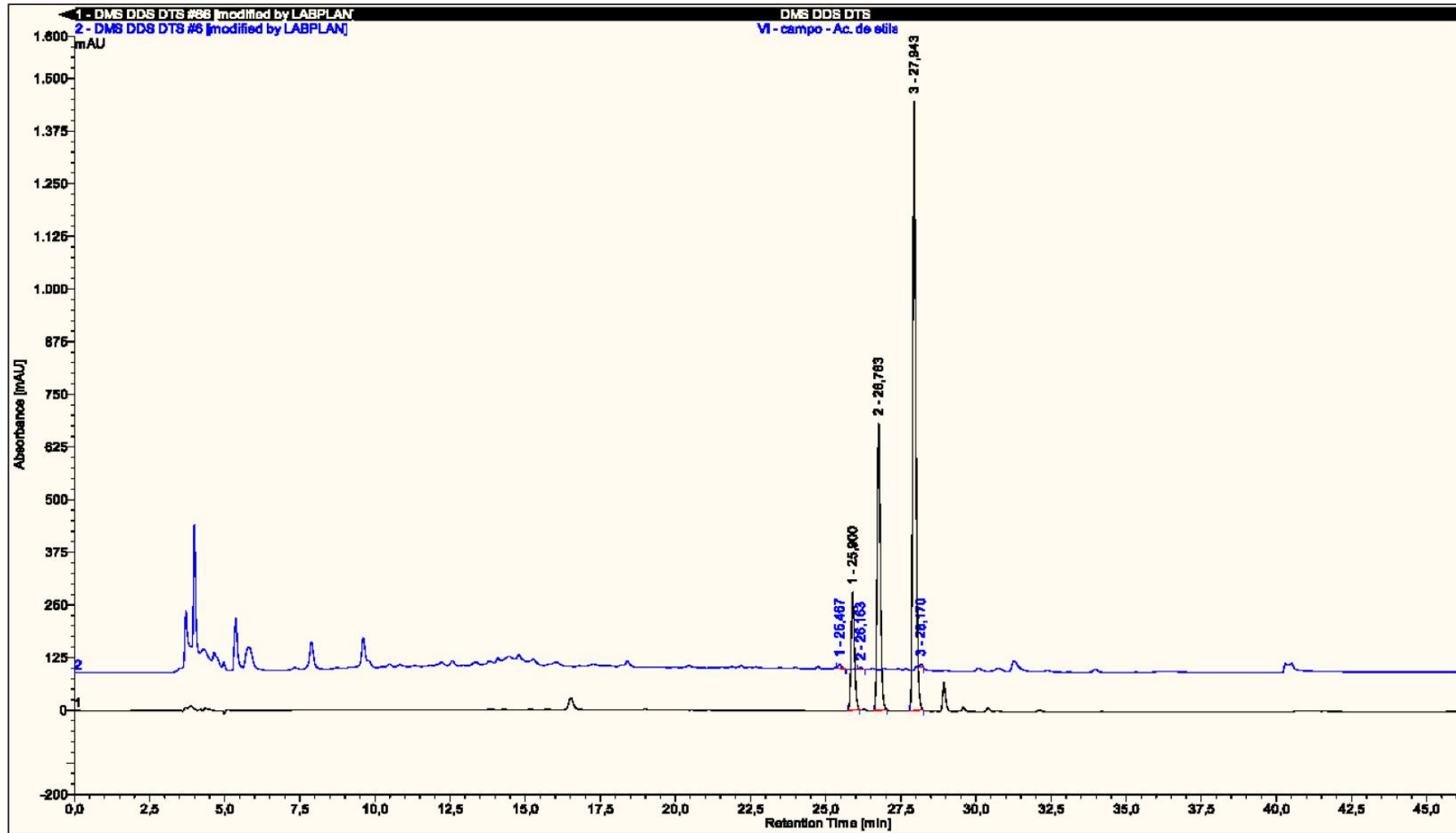
Legenda: Extrato de folhas de campo em linha azul, padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R:25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

Figura 43 - Cromatograma população MG, extrato de acetato de etila, folha de campo.



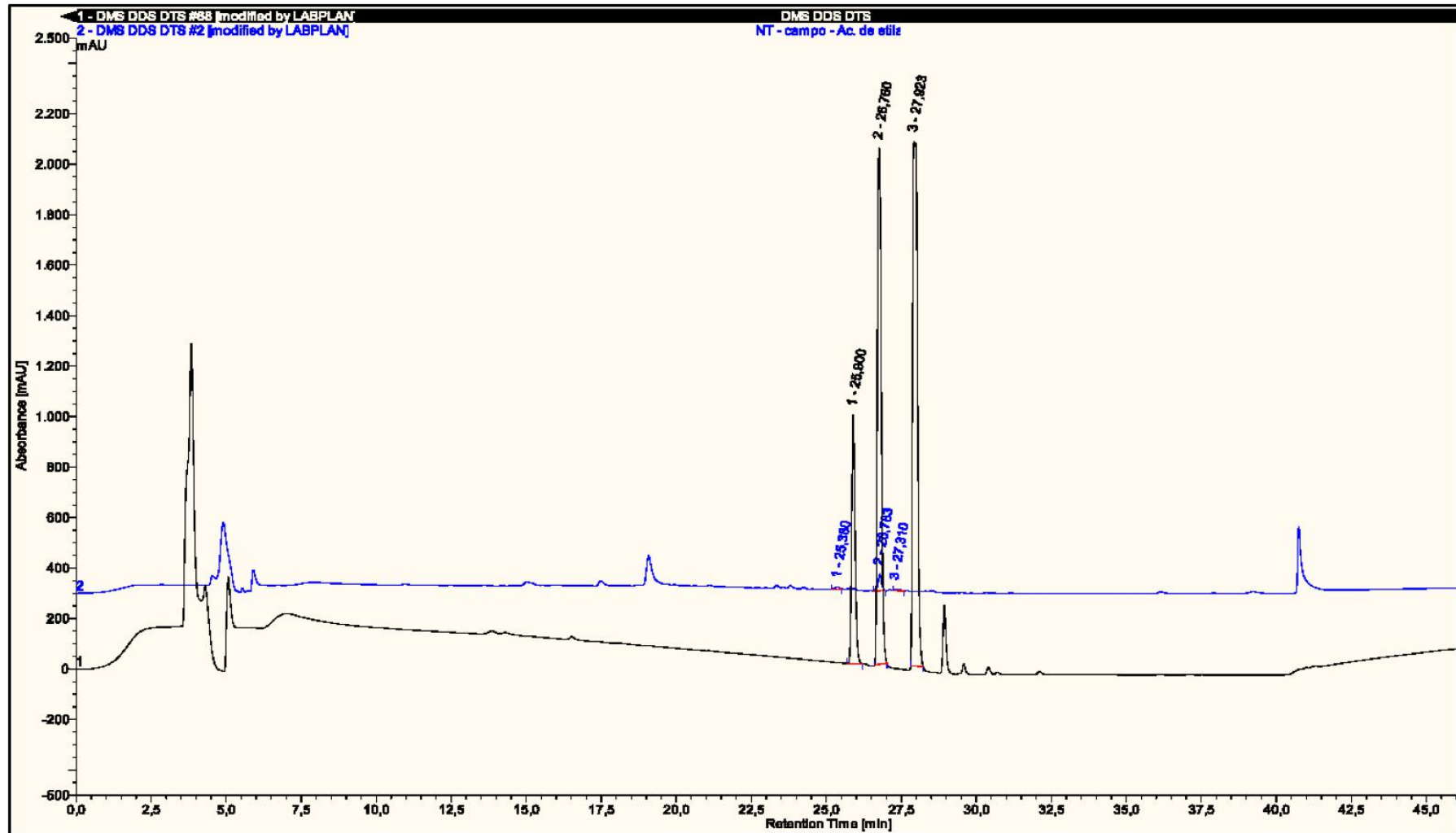
Legenda: Extrato de folhas de campo em linha azul, padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R:25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

Figura 44 - Cromatograma da amostra de VI, extrato de acetato de etila, folha de campo.



Legenda: Extrato folhas de campo em linha azul, padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R.:25.900); DDS (T.R.: 28.783) e DTS (T.R.: 27.943).

Figura 45 - Cromatograma população NT, extrato de acetato de etila folhas de campo.



Legenda: Extrato de folhas de campo em linha azul, padrões de polissulfetos em linha preta. DMS (T.R:25.900); DDS (T.R: 28.783) e DTS (T.R: 27.943).

4.6 Detecção de efeito genotóxico/antigenotóxico

4.6.1 Efeito dos extratos na topologia do plasmídeo

Nos tratamentos com os extratos aquosos, as moléculas de DNA plasmidial apresentaram conformações estruturais diversas, representadas pelos padrões característicos de bandas (superhelicoidizada, circular ou linear). O tratamento da solução plasmidial com extrato aquoso de plantas de campo promoveu lesões tipo quebra no DNA, caracterizado como Forma I, em DNA circular, caracterizado como Forma II e em linear como Forma III, entretanto, esse efeito foi variável e dependente da concentração testada e da população utilizada (Figura 46).

Os tratamentos realizados com a solução de plasmídeo e extrato aquoso de *P. alliacea* de campo (Figura 46A , C, E , G - raias 3,4,5) e com extratos de plantas *in vitro* (Figura 46B , D, F , H - raias 3,4,5) causou quebra simples (Figura 46A ,C , G - raia 3) e quebras de cadeia dupla (Figura 46B - F - raias 3,4,5). Nas amostras das populações de MG e VI *in vitro* foram observadas quebras duplas na raia 5 e nas raias 4 e 5, respectivamente, que levaram à conversão da forma I (DNA íntegro - superhelicoidizado) para forma III (circular). Este efeito foi influenciado pela concentração do extrato e pela origem das plantas testadas.

Diferentes perfis de amostras da população NT campo e *in vitro* , e, aparentemente, extratos de plantas *in vitro* de todas as plantas foram capazes de quebrar o DNA em diferentes concentrações (Figura 46A, B - raias 3,4,5), como mostrado por análise semi - quantitativa das bandas correspondentes no gel, a diminuição da concentração do DNA, corresponde a presença de quebra do DNA, de forma II (circular) e / ou forma III (linear) (Figura 46 – Gráfico A, B) .

Amostras MG campo e *in vitro* mostraram um perfil eletroforético semelhante, sendo observando, na análise quantitativa de extratos de campo, a formação de quebras simples (Forma II) (Figura 46C - gráficos 3,4) e quebras duplas (Forma III) (Figura 46C - gráfico raia 5), enquanto que, nas baixas concentrações de extratos de plantas *in vitro* só foi produzida a forma III (Figura 46D – gráfico raias 3, 4). A Forma II aparece apenas na concentração mais elevada do extrato (Figura 46D – gráfico raia 5) .

Amostras MH de campo mostraram a formação significativa de ambos os tipos de lesões (quebra simples e dupla), somente na concentração mais elevada testada (Figura 46E - raia 5). Por outro lado, todas as concentrações de amostras *in vitro* exibiram quebras simples e duplas, na concentração mais baixa (Figura 46F - raias 3,4,5) .

Nas amostras VI de campo foram observadas quebras simples em todos os indivíduos, em todas as concentrações testadas, mas não foram detectadas quebras duplas (Figura 46E - raias 3,4,5). Em relação às amostras *in vitro* foi observada a formação de quebras simples na concentração mais baixa (Figura 46H - raia 3), enquanto os dois tipos de lesões foram observados (Figura 46H - raias 4,5).

O potencial antigenotóxico dos extratos foi avaliado com base em sua capacidade de bloquear, ou reduzir, a ocorrência quebras no DNA quando as moléculas de DNA plasmidial foram tratadas com SnCl₂. O protocolo experimental também é baseado na mobilidade do DNA plasmidial, em um gel de agarose submetido a um campo elétrico. O DNA plasmidial (pUC 9.1) tratado com SnCl₂ levou à conversão de DNA na Forma I para a Forma II e III , um padrão que foi utilizado como controle positivo para este tipo de lesão (Figura 46 - raia 2).

Um efeito protetor foi observado na presença de extratos de plantas NT *in vitro* (Figura 46B - raias 6,8). Este efeito também foi detectado nas amostras de campo MH (Figura 46E - raias 7,8) e VI (Figura 46G - raias 6,7), mas com as outras amostras *in vitro* esse efeito não foi observado (Figura 46D), ou não foi conclusivo (Figura 46F – raias 6,7,8).

Esses resultados encontram-se descritos no artigo: **EXTRACTS FROM FIELD AND IN VITRO PLANTS OF *Petiveria alliacea* L. ON PLASMIDIAL DNA**, publicado na revista **Journal of Medicinal Plant Research** (Anexo 1).

Figura 46 - Avaliação qualitativa e semi-quantitativa do efeito do extrato aquoso de *Petiveria alliacea* em DNA plasmidial (pUC 9.1).

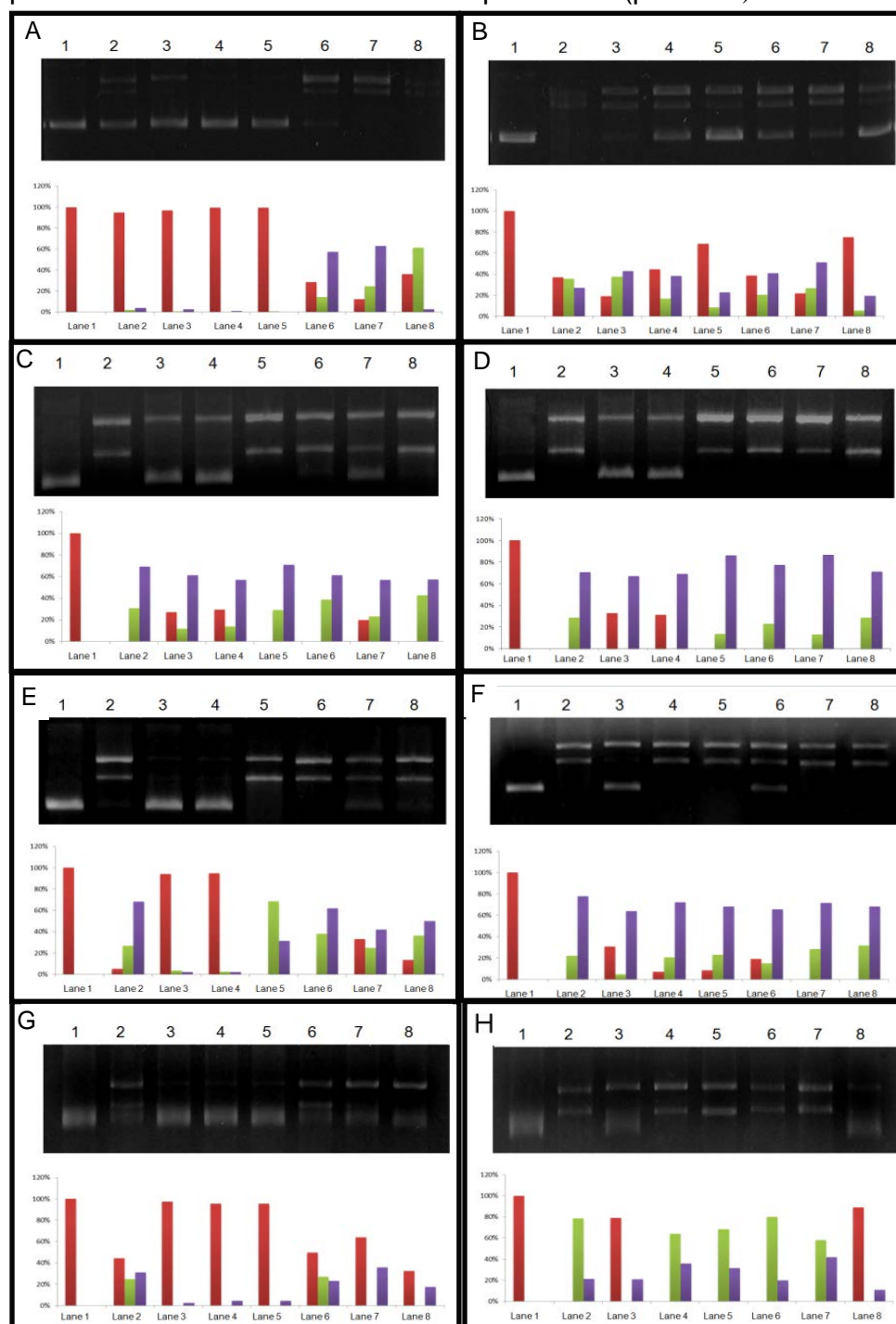


Figura 45: Avaliação qualitativa e semi-quantitativa do efeito do extrato aquoso de *Petiveria alliacea* em DNA plasmidial (pUC9.1). Bandas correspondentes à solução de plasmídeo (100 ng) tratadas com extratos (0 – 1.0 – 5.0 – 10 mg/L). A - amostra NT campo; B - amostra NT *in vitro*; C - amostra MG campo; D - amostra MG *in vitro*; E - amostra MH campo; F - amostra MH *in vitro*; G - amostra VI campo; H - amostra VI *in vitro*. As barras dos gráficos representam medidas densitométricas das bandas pelo Programa Image J.

Gráficos: ■ Forma I (intacta), ■ Forma II (circular), ■ Forma III (linear).

DISCUSSÃO

Cultura de tecidos vegetais

Os protocolos de multiplicação *in vitro* estabelecidos neste trabalho, a partir de amostras de populações selecionadas de *Petiveria alliacea* do Rio de Janeiro constituem ferramentas importantes para estudos fitoquímicos e farmacológicos, contribuindo também para a conservação e propagação comercial desta espécie, assim como tem sido relatado para outras espécies com potencial medicinal (HOU, et al., 2015; NARANJO et al., 2015; VARGHESE, et al., 2016).

Em função da grande diversidade química e importância farmacológica da espécie *Petiveria alliacea*, vários estudos vem sendo desenvolvidos visando à produção biotecnológica de plantas e metabólitos de interesse, através da cultura de tecidos vegetais (CANTELMO et al., 2013; WEBSTER et al., 2008). A utilização de segmentos nodais de plantas de campo, na etapa da micropropagação, tem sido relatada em diversos trabalhos com diferentes espécies vegetais (GAGLIARDI et al., 2000; RANI et al., 2006). A espécie estudada neste trabalho também foi propagada *in vitro*, anteriormente, através da cultura de segmentos nodais, gerando plantas com as mesmas características fenotípicas da planta matriz (CASTELLAR et al. 2011). No entanto, a produção de uma única planta a partir de cada explante tornou-se um fator quantitativamente limitante para a exploração fitoquímica e farmacológica, a partir de extratos de folhas e de raízes, órgãos onde a síntese e acumulação de polissulfetos é mais significativa (DE SOUZA, 1990; DELLE-MONACHE; SUAREZ, 1992, DELLE-MONACHE; MENICHINI; SUAREZ, 1996; KUBEC; KIM; MUSAH, 2002; KUBEC; KIM; MUSAH, 2003; HERNÁNDEZ et al., 2014; LUZ et al., 2016).

Visando ao estabelecimento *in vitro* de plantas doadoras, assim como facilitar o processo de descontaminação, sementes foram germinadas *in vitro*, entretanto, as plantas obtidas apresentaram dificuldade para o enraizamento espontâneo. Em trabalho anterior, os brotos transferidos para MS0 mostravam uma frequência de 40% de enraizamento, chegando a 100% em presença de AIA a 0,6µM

(CASTELLAR et al., 2011). Neste trabalho, o mesmo protocolo foi aplicado nas amostras *in vitro* das populações de NT, VI e MG, para a obtenção de plantas com raízes. As amostras da população de MG não desenvolveram raízes nesta condição, nem quando nelas foram aplicadas outras auxinas. Entretanto, após dois anos de cultura, estas amostras, adaptadas as condições da câmara de crescimento, começaram a desenvolver raízes no meio de cultura padrão para a espécie (MS com metade dos sais, suplementado com AIA 0,6 μ M).

Outros protocolos foram estabelecidos na busca de aumentar as taxas de micropropagação para obter sistemas de produção de plantas e metabólitos secundários desta espécie. Assim, foi estabelecida a micropropagação a partir de segmentos apicais excisados das plantas germinadas *in vitro*, a partir de população de campo. Como vários relatos descrevem taxas elevadas de multibrotação em presença de citocininas, a multibrotação neste trabalho foi avaliada em presença de BAP e TDZ. Embora os resultados tenham variado em função da população estudada, o BAP foi mais efetivo que TDZ, fornecendo em média 4,2 brotos por explante, considerando todas as populações. Entretanto, já foram descritas taxas de multibrotação mais elevadas (6 – 8 brotos por explante) com a utilização de combinações de auxinas e citocininas (SOARES, 2011), abrindo uma perspectiva de otimização destas taxas com as populações estudadas.

A embriogênese somática em *P. alliacea* foi desenvolvida anteriormente (WEBSTER et al., 2008; CANTELMO et al., 2013) e permitiu determinar uma taxa elevada de síntese de polissulfetos nestas estruturas, na ordem de trinta vezes mais do que a produção natural nas raízes (WEBSTER et al., 2008). Neste trabalho, a aplicação de protocolo previamente estabelecido para induzir a embriogênese a partir de folhas, foi obtida uma taxa de multiplicação aproximada, em torno de 5 - 7 embriões somáticos para cada embrião somáticos inoculado no mesmo meio de cultivo, avaliados em 30 dias (CANTELMO et al., 2013). A taxa de multiplicação embriogênica obtida com as diferentes populações, neste trabalho, foi semelhante (4 – 6 ES por ES inoculado), mesmo considerando as diferentes origens dos embriões (folhas e raízes), indicando que, para esta espécie, a origem dos embriões não afetou a multiplicação.

A cultura de raízes induzidas por diferentes auxinas (AIB, AIA, ANA e 2,4D), foi estabelecida pela primeira vez neste trabalho e mostrou, como principal resultado, a

produção de embriões somáticos a partir de novelos derivados das raízes. Com exceção do AIB, esta resposta foi independente da concentração ou do genótipo, uma vez que foi observada em todas as populações de *P. alliacea* avaliadas (MG, NT, MH e VI). Não foram encontrados na literatura, relatos de respostas regenerativas semelhantes a partir de raízes em outras espécies.

Em relação à embriogênese somática, já foi determinada a origem direta dos embriões formados na superfície de folhas, de plantas *in vitro* desta espécie, em resposta ao regulador PIC (CANTELMO et al., 2013). Entretanto, a embriogênese a partir da raiz, neste trabalho, foi considerada, possivelmente, de origem direta, necessitando ainda de confirmação, uma vez que, além dos embriões oriundos de tecidos vasculares, foram também identificados centros meristemáticos, que poderiam originar as gemas radiculares, ou calos, ainda não detectados naquele momento da cultura. Entretanto, ainda não foi possível esclarecer totalmente a origem dos embriões somáticos a partir de raízes. Massas calogênicas que surgiram após a transferência dos materiais para o meio semi-sólido, provavelmente se originaram a partir da desdiferenciação dos próprios embriões somáticos, e se diferenciaram posteriormente gerando novos embriões de forma indireta, assim como raízes, em fenômeno já observado anteriormente (WEBSTER et al., 2008).

O protocolo de conversão de embriões somáticos de raízes a plantas completas foi otimizado neste trabalho, com a obtenção de altas taxas de conversão em todas as amostras (53%), em comparação com o protocolo anterior que descrevia taxas máximas de 5% de conversão avaliada em câmara de crescimento (CANTELMO et al., 2013). Esta resposta foi otimizada em função apenas da estabilização das condições físicas de incubação em BOD.

Em relação à produção de raízes adventícias o protocolo ainda requer otimização, uma vez que o aumento da biomassa de raízes sem enovelamento e sem a formação de embriões somáticos ocorreu apenas em presença do fitorregulador AIB, na concentração mais baixa (1,02 μM). A presença de luz e a utilização de carvão ativado no meio de cultura foram avaliados em todas as populações. Embora os resultados para aumentar a biomassa de raízes não tenham sido significativos nestas condições, as raízes mantidas em meio MS suplementado com carvão ativado e AIB (2,04 μM) das amostras da população AL deram origem a brotos

diretamente das raízes, o que sugere a presença de raízes gemíferas na espécie, abrindo uma nova vertente de investigação visando a produção de plantas *in vitro*, a exemplo do que foi relatado para outras espécies medicinais (PACHECO et al., 2008 b).

Resumindo, a micropropagação foi obtida tanto por multiplicação meristemática, a partir de segmentos nodais e ápices caulinares de regenerantes primários, quanto por conversão de embriões somáticos oriundos de folhas ou raízes *in vitro*. Além disso, foi determinado um processo de organogênese direta de brotos, a partir de raízes da população de NT mantidas no escuro na presença de carvão ativado 0,2%, indicando um possível para a resposta organogênica nesta espécie, a ser investigado futuramente.

Criopreservação

A técnica de vitrificação utilizada em trabalho anterior com *P. alliacea* (Pettinelli, 2013) foi a metodologia aplicada aos embriões somáticos formados nas culturas de raízes a partir das populações estudadas neste trabalho. Foi observado na população de NT, que após 60 dias em cultura, os embriões somáticos criopreservados não mantiveram a sua taxa de multiplicação. Os embriões somáticos se mantiveram vivos, porém apresentarem apenas o aumento de volume. Entretanto, nas outras populações avaliadas (MH, MG e VI), os embriões somáticos após a criopreservação não apresentaram viabilidade. A avaliação da estabilidade genética e fitoquímica das plantas convertidas a partir desses embriões foi realizada com material da população NT. Entretanto, o resultado negativo com as demais, indica que a resposta de tolerância à técnica de criopreservação utilizada depende da origem das amostras como relatado na literatura com outras espécies (JAN et al., 2015; TAGIPUR et al., 2016).

Monitoramento da estabilidade genética

A capacidade de explantes meristemáticos de *P. alliacea* originarem brotos, mesmo em ausência de fitorreguladores é particularmente importante para manter a estabilidade genética do material a ser clonado (CASTELLAR et al., 2011), tanto para a propagação em massa como para conservação *in vitro*. Entretanto, a necessidade de dispor de protocolos de multiplicação com elevada taxa, assim como protocolos específicos de criopreservação, requer o uso de fitorreguladores de diferentes tipos e concentrações (TYUB; KAMILI; BHAT, 2016). Neste trabalho, a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura, da mesma forma que o uso de crioprotetores, aumentaram o risco de variação somaclonal nos materiais produzidos e conservados *in vitro*, indicando a necessidade do monitoramento da estabilidade genética dos materiais produzidos biotecnologicamente, como descrito para outras espécies medicinais (SEBASTIANI; FICCADENTI, 2016).

A avaliação preliminar com base em marcadores RAPD forneceu dados de similaridade e diversidade entre as quatro populações, mostrando a formação de dois grupos distintos cuja similaridade obedeceu a um padrão de proximidade geográfica entre as populações. A literatura mostra que composição genética de amostras coletadas em diferentes regiões tem sido avaliada principalmente por marcadores RAPD (ASHWINI et al., 2015; GOIS et al., 2014; ARIF et al., 2010).

RAPD também tem sido o marcador mais usado para a detecção de variabilidade genética nas plantas clonadas *in vitro* através das diferentes vias de regeneração (AYDIN et al., 2015; JOSE; THOMAS, 2015). Este método foi selecionado para este trabalho por ser especialmente vantajoso para a caracterização de plantas *in vitro*, já que requer quantidades muito pequenas de DNA. Além disso, apresenta muitas vantagens práticas quando comparado a outros marcadores, pois os padrões são consistentes e independem da idade da planta (WELSH; MCCLELLAND, 1990; MICHELI et al, 1994). Além disso, as informações são fornecidas rapidamente, dispensando qualquer informação genética sobre a espécie, o que é muito importante no estudo de plantas medicinais nativas como *P. alliacea*, pois os dados de sequência não estão disponíveis em organismos cujo genoma não foi sequenciado até o presente (SHINDE et al., 2007).

O elevado índice de polimorfismo, identificado entre os clones de *P. alliacea* produzidos por diferentes processos regenerativos, era um fenômeno esperado, em função de alterações causadas nos ciclos celulares dos explantes submetidos à ação de fitorreguladores e às pressões artificiais causadas pelo ambiente *in vitro* (AYDIN et al., 2015; JOSE; THOMAS, 2015). Os resultados da análise RAPD neste trabalho permitiram a identificação de vários marcadores RAPD capazes de discriminar variedades intraespecíficas e interclonais, confirmando a indicação desta técnica para o monitoramento da estabilidade genética de plantas produzidas em cultura de tecidos, o que vai possibilitar um maior controle da qualidade do material.

Análise Fitoquímica

A utilização da técnica (cromatografia em camada delgada) para a identificação das diferentes substâncias químicas presentes no vegetal tem sido muito aplicada devido à simplicidade do método, que é rápido e de fácil visualização (MIGUEL, 2015; MUNIROH, et al., 2014). Neste trabalho, a CCD detectou os polissulfetos presentes em plantas de *P. alliacea*, das diferentes populações oriundas de campo (NT - VI – MG e MH) e das culturas obtidas *in vitro* (XIMENES 2008). Entretanto, a técnica de CG-EM, usada para definição do perfil fitoquímico não detectou polissulfetos nas amostras. Todavia, esta técnica permitiu a definição dos extratos etanólico e de acetato de etila como mais adequados à investigação, em função da alta diversidade química encontrada. A CG-EM tem sido relatada como ideal para detecção e quantificação de substâncias voláteis inclusive em *P. alliacea* (KUBEC; KIM; MUSAH, 2002). Entretanto, neste trabalho, os cromatógrafos utilizados foram capazes de detectar quantidades muito pequenas de substâncias sulfurosas, na ordem de picogramas, presentes nos extratos analisados. Entretanto, em virtude da técnica, a quantidade de extrato injetada na coluna é menor, pois passa por um divisor de amostras (*split*), que pode ter contribuído para a diminuição da concentração e por isso os derivados polissulfurados não foram detectados (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A identificação dos diferentes polissulfetos também foi relatada em trabalhos anteriores pela técnica da cromatografia líquida de alta eficiência, com a utilização

uma coluna guarda, importante para a detecção de substâncias não polares (WEBSTER et al, 2008). Entretanto, como a identificação dos diferentes polissulfetos também já foi descrita com o uso de coluna RPC18 (HERNÁNDEZ et al., 2014). Nestas análises, foi possível a identificação dos diferentes polissulfetos em todas as amostras analisadas, utilizando a técnica da CLAE em fase normal. Nesta técnica a quantidade de extrato necessária para detecção também é na ordem de picogramas, mas não existindo um divisor de amostra há um aumento da quantidade injetada na coluna cromatográfica, possibilitando a identificação dos polissulfetos neste sistema (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Efeito biológico

Espécies vegetais que apresentam produtos sulfurosos possuem um amplo espectro de atividades terapêuticas, apresentando propriedades neurotóxicas e citostáticas (ROSNER et al., 2001). Em avaliação realizada na Universidade de Illinois (USA), utilizando-se cerca de 1.400 extratos de plantas com potencial para prevenção e tratamento de câncer, determinou-se que *P. alliacea* faz parte das 34 plantas com atividade antineoplásica comprovada nesse estudo (TAYLOR, 2005).

A liberação de medicamentos fitoterápicos pode exigir uma avaliação da toxidez, ao nível do genoma, e modelos usando DNA plasmidial têm se mostrado muito úteis nas avaliações da genotoxicidade causada por diversos agentes químicos e físicos. Dentre as metodologias disponíveis para avaliar a potencialidade genotóxica dos extratos destaca-se a comparação do perfil eletroforético de amostras de DNA plasmidial, tratadas, ou não, com o extrato vegetal em estudo, técnica que foi estabelecida anteriormente para *Petiveria alliacea*, no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV) (SOARES, 2011). Quando o extrato é capaz de induzir lesões do tipo quebra (simples ou dupla), a conformação estrutural do plasmídeo se altera, resultando em perfil eletroforético diferente daquele produzido pelo DNA íntegro (DE MATTOS et al., 2004).

Portanto, a eletroforese é uma ferramenta muito útil para a separação de diferentes conformações estruturais apresentadas pelo DNA plasmidial, e também pode ser

usada para o estudo do efeito antigenotóxico (DE MATTOS et al., 2000). Neste modelo de estudo, o DNA plasmidial é previamente tratado com um agente químico capaz de promover danos oxidativos e lesões mensuráveis. A ação deste agente pode ser inibida ou diminuída quando utilizado em conjunto com os extratos vegetais no tratamento do plasmídeo, promovendo a proteção contra as lesões causadas por este agente isoladamente. Desta forma é possível detectar o potencial antigenotóxico, que, indiretamente, pode se traduzir em efeito “antioxidante” do extrato em estudo.

Em *P. alliaceae*, a avaliação dos efeitos toxicológicos do extrato aquoso, foi realizada visando contribuir para o monitoramento de plantas produzidas em cultura de tecidos, uma vez que o controle de qualidade de material clonal produzido biotecnologicamente deve considerar não só a constituição genética, mas também o perfil fitoquímico, farmacológico e toxicológico das plantas (MELO et al., 2007; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO et al., 2010).

A avaliação da mobilidade eletroforética diferencial do DNA plasmidial tratado com extratos vegetais, usada neste trabalho para avaliar o efeito biológico (tóxico ou protetor) no DNA, vem sendo usada por outros pesquisadores para estudar as propriedades oxidantes e/ou antioxidantes de diferentes produtos naturais (REINIGER et al., 1999;. BISO et al., 2010; HAMEDT et al., 2013). Assim, é possível acompanhar a ocorrência de diferentes tipos de lesões (quebras simples ou de cadeia dupla) com base na intensidade e posição das bandas produzidas por electroforese (DE MATTOS et al., 2004).

A avaliação do potencial genotóxico de *P. alliaceae* demonstrou que a ocorrência de alterações na topologia do plasmídeo foi influenciada pela concentração dos extratos e do genótipo da planta. No entanto, os efeitos genotóxicos foram mais fortes com extratos de plantas *in vitro* do que com aqueles obtidos a partir de amostras de campo, possivelmente devido a diferenças ambientais entre condições naturais e o ambiente da cultura.

É possível que as condições de estresse em culturas artificiais sejam até mais intensas do que em condições naturais, onde as plantas evoluíram e encontram-se melhor adaptada. Desta forma, os metabólitos induzidos na cultura não seriam formados em condições naturais, devido ao silenciamento cultura não seriam

formados em condições naturais, devido ao silenciamento de alguns genes. Além disso, a possibilidade de respostas específicas não podem ser descartada.

Neste trabalho, foi demonstrado que extratos aquosos contêm componentes capazes de induzir quebras simples e duplas na molécula de DNA. Como estas lesões podem conduzir a inativação de células ou potencializar a capacidade mutagênica (FRIEDBERG et al., 2006), indica-se a necessidade de aprofundar tais estudos em outros modelos experimentais, como bactérias e células eucarióticas.

Alguns estudos já sugeriram que vários extratos ou metabólitos desta espécie podem exibir tanto atividade pró-oxidante quanto antioxidante (CARLINI, 2003; ANDRADE et al, 2012). Estas abordagens poderiam ser usadas para monitorar a qualidade das plantas produzidas em cultura de tecidos vegetais visando estudos farmacológicos.

A mobilidade eletroforética de DNA plasmidial tratado com extratos vegetais tem sido usada, com modificações, para avaliar a antigenotoxicidade de diversas espécies de plantas (DE MATTOS et al, 2000;. LEE et al., 2002; KUMAR; KAUR; ARORA, 2010). Neste caso específico, a adição de cloreto estanoso na mistura de reação, potencializa a formação de radicais hidroxila que reagem com o DNA do plasmídeo, produzindo quebras simples e duplas, possibilitando o acompanhamento da ocorrência e do tipo de lesão, pela intensidade e posição das bandas produzidas no gel de agarose.

Neste trabalho, a avaliação do potencial antigenotóxico dos extratos foi demonstrado em todas as amostras (campo e *in vitro*), se traduzino como um efeito geral de proteção contra lesões causados por SnCl₂, com pequena variação influenciada pela origem vegetal. Esta atividade antioxidante era esperada em função dos diferentes flavonoides identificados nesta espécie (DELLE-MONACHE et al, 1996; OKADA et al., 2008). De fato, muitos estudos estão focados na atividade antioxidante de plantas medicinais (KUMAR; KAUR; ARORA, 2010). A maioria das substâncias antioxidantes pertencem à classe de substâncias fenólicas, como fenóis, flavonoides, isoflavonas, alfa-tocoferol e antocianinas, e uma relação direta entre compostos fenólicos e atividade antioxidante nos extratos já foi relatada por vários pesquisadores (GOLLUCKE-BOIAGO et al., 2008; CHIRINOS et al, 2008; SHRIFIFAR; DEHGHN-NUDEH; MIRTAJALDINI, 2009; DU et al. 2009; CONFORTI et al., 2009).

A capacidade de diferentes extratos de plantas para proteger DNA do plasmídeo íntegro contra os efeitos deletérios de radicais hidroxila gerados durante o metabolismo foi avaliada por um teste que detecta alterações na conformação estrutural de plasmídeos. Este teste tem sido amplamente usado, com modificações para avaliar a antigenotoxicidade de diversas espécies de plantas (DE MATTOS et al., 2000; LEE et al., 2002; KUMAR et al., 2010). Neste caso específico, a adição de cloreto estanoso na mistura de reação, potencializa a formação de radicais hidroxila que reagem com o DNA do plasmídeo, produzindo quebras simples e duplas (Formas II e III), possibilitando acompanhar a ocorrência e tipo de lesão (simples ou duplas) pela intensidade e posição das bandas produzidas no gel de agarose. Por conseguinte, a banda correspondente ao DNA íntegro torna-se menos intensa quando o DNA é quebrado por radicais OH, e as bandas características das lesões apresentam-se mais intensas (DE MATTOS et al., 2004).

Na avaliação da antigenotoxicidade, a mudança na posição da banda obtida em relação ao DNA danificado pelo cloreto estanoso, mostrou um efeito protetor do extrato de acordo com os resultados obtidos para outras espécies (DE MATTOS et al., 2000, 2004). A atividade antioxidante e o potencial antineoplásico poderiam resultar da presença de substâncias diferentes, incluindo flavonoides já relatados na espécie (DELLE-MONACHE e SUAREZ, 1992; DELLE-MONACHE; MENICHINI; SUAREZ, 1996; OKADA et al., 2008; SOARES et al., 2013).

Assim, metodologias para avaliar a toxicidade dos extratos podem ser utilizadas para monitorar o material produzido em cultura de tecidos vegetais garantindo a qualidade da produção *in vitro*.

CONCLUSÕES

Cultura de tecidos vegetais

- ✓ A produção de plantas da espécie *Petiveria alliacea in vitro* foi aumentada em presença de citocininas, obtendo-se cerca de 4 brotos por explante em trinta dias de cultura, dependendo da população e do tipo de citocinina utilizada.
- ✓ A embriogênese somática, estabelecida neste trabalho a partir de raízes, é um fenômeno dependente de auxinas, tendo sido padronizada para a espécie pela cultura em presença de IBA 20,04 μM com taxa de multiplicação de cerca de 5 ES por ES inoculado, dependendo da população considerada.
- ✓ As condições controladas de temperatura e fotoperíodo do BOD permitiram taxas elevadas de conversão de embriões somáticos a plantas (53%) abrindo uma nova vertente para a obtenção de plantas, a partir de raízes, independentemente da origem das amostras.
- ✓ A produção de raízes adventícias estabelecida em resposta ao cultivo em presença de AIB 1,02 μM , foi dependente da origem da amostra, com taxas de produção de biomassa na ordem de 40%.

Criopreservação

- ✓ A criopreservação de embriões somáticos oriundos de raízes da população NT através da técnica de vitrificação em PVS2 foi realizada com sucesso. Entretanto o protocolo necessita de otimização para utilização com as outras populações de *P. alliacea*.

Monitoramento fitoquímico

✓ Os polissulfetos MDS, DDS e DTS podem ser utilizados como marcadores fitoquímicos em plantas produzidas *in vitro*, por diferentes vias regenerativas, tendo sido detectados com sucesso nos extratos etanólicos (100% e 70%) e acetato de etila, por meio das técnicas CLAE e CCD.

Monitoramento genético

✓ Foi confirmada a ocorrência de variação somaclonal em plantas e materiais vegetais produzidos *in vitro*, através de multibrotação induzida por citocininas, assim como de embriogênese somática induzida por auxinas a partir de folhas ou raízes.

✓ Foram determinados nove iniciadores RAPD adequados para caracterização de um perfil genético das quatro populações de campo de *Petiveria alliacea* estudadas.

✓ O RAPD foi adequado para o monitoramento genético das amostras produzidas *in vitro* os perfis foram caracterizados através da utilização de seis iniciadores polimórficos capazes de discriminar clones oriundos de diferentes processos regenerativos.

Efeito genotóxico

- ✓ Extratos de plantas de campo, assim como de culturas *in vitro* demonstraram um efeito genotóxico em DNA plasmidial.
- ✓ O efeito genotóxico foi influenciado pela concentração dos extratos e pelo genótipo da planta e foi mais forte com extratos de plantas *in vitro* do que com aqueles obtidos a partir de amostras de campo.
- ✓ Extratos de plantas de campo, assim como de culturas *in vitro* demonstraram um efeito protector contra lesões causadas por SnCl_2 .

PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliação dos fitorreguladores ANA, AIA, 2,4D no desenvolvimento de embriões somáticos a partir de raízes.
- ✓ Otimização da multiplicação de brotos, a partir de ápices caulinares, utilizando-se combinação de auxinas e citocinicas.
- ✓ Otimização da técnica de criopreservação dos embriões somáticos das diferentes população de *P. alliacea*.
- ✓ Complementação da avaliação comparativa da potencialidade genotóxica ou antigenotóxica a partir de extratos alcoólicos e frações.
- ✓ Investigação fitoquímica das nas plantas *in vitro* das populações de MG, MH e VI por CLAE.
- ✓ Estabelecimento de outros marcadores moleculares para o monitoramento da estabilidade genética e epigenética.

REFERÊNCIAS

- ALVES, H.M. *A diversidade química das plantas como fontes de fitofármacos*. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n 3, p.10 -15, 2001.
- AN, H.; ZHU J.; WANG, X.; XU, X. Synthesis and anti-tumor evaluation of new trisulfide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 4826-4829, 2006.
- ANDRADE, S.R.M. *Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações*. 1° edição. Planatina, DF. Embrapa Cerrados, 2011.
- ANDRADE, T.M.; MELO A.S; DIAS, R.G;C;, VARELA, E.L.P.; OLIVEIRA, F.R.; VIEIRA, J.L.F.; ANDRADE, M.A.; BAETAS, A.C.; MONTEIRO, M.C.; MAIA, C.S.F. Potential behavioral and pro-oxidant effects of *Petiveria alliacea* L. extract in adult rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 143: p. 604–610, 2012.
- ARIF, I.A.; BAKIR, M.A.; KHAN, H.A.; FARHAN, A.H.; HOMAIDAN, A.A.; BAHKALI, A.H.; SADOON, M.; SHOBRAK M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. International. **Journal Molecular Sciences**, v. 11, p. 2079-2096, 2010.
- ASHWINI, A. M.; RAMAKRISHNAIAH, H.; MANOHAR, S. H.; MAJUMDAR, M. An efficient multiple shoot induction and genetic fidelity assessment of *Exacum bicolor* Roxb., an endemic and endangered medicinal plant, **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.51, p. 659–668, 2015.
- AYDIN, M.; TASPINAR, M. S.; ARSLAN, E.; SIGMAZ, B.; AGAR, G. Auxin effects on somaclonal variation and plant regeneration from mature embryo of barley (*Hordeum Vulgare* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v.47,n 5, p. 1749 - 1757, 2015.
- BAO, Y.; MO, X.; XU, X.; HE, Y.; XU, X.; AN, H. Stability studies of anticancer agent bis (4- fluorobenzyl) trisulfide and synthesis of related substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 664-671, 2008.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, p.396–398, 2007.
- BISO, F. I.; RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; REIS, M.B.; BERNARDI, C. C.; DE MATTOS, J. C. P.; CALDEIRA-DEARAUJO, A.; VILEGAS, W.; CÓLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. Assessment of dna damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davila nitida* and *Davila elliptica* (Dilleniaceae) **Mutation Research Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis** v. 702, p. 92 – 99, 2010.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica (2006). *A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos/Ministério da Saúde*, Brasília: Ministério de Saúde, 148 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde) ISBN 85-334-1187-1.

CAMARGO, M.T.L.A. Contribuição etnofarmacobotânica ao estudo de *Petiveria alliacea* L. –Phytolacaceae- (“amansa-senhor”) e a atividade hipoglicemiante relacionada a transtornos mentais. **Dominguezia**. v.23, n° 1, p.21-27, 2007.

CANO, J.H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.293-316, 2004.

CANTELMO, L.; SOARES, B.O.; ROCHA, L.P.; PETTINELLI, J.A.; CALLADO, S.H.; MANSUR, E.; GAGLIARDI, R.F. Repetitive somatic embryogenesis from leaves of the medicinal plant *Petiveria alliacea* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.115, p.385–393, 2013.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501 – 512, 2003.

CASTELLAR, A. **Cultura de tecidos e perfil fitoquímico de *Petiveria alliacea* L.** 2006. 120 folhas (Dissertação - Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.

CASTELLAR, A.; GAGLIARDI, R.F.; MANSUR, E. *In vitro* propagation and establishment of callus and cell suspension cultures of *Petiveria alliacea* L., a valuable medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.57, p. 1113-1120, 2011.

CDB – A convenção sobre a diversidade biológica. Decreto Legislativo nº. 2, de 5 de junho de 1992. Brasília – DF, **Ministério do Meio Ambiente – MMA**, 2000.

CHEN, M.; LV, S.; MENG Y. Epigenetic performers in plants. **Development Growth & Differentiation**, v.52, p.555–566, 2010.

CHIRINOS R, CAMPOS D, WARNIER M, PEDRESCHI R, REES J, LARONDELLE Y Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, v. 111, p. 98-105, 2008.

CID, L. P.; B. *Cultura in vitro* de plantas. 3° edição. Brasília, DF. **Embrapa**, 325p.:il, 2014.

CLAIN, C.; DA SILVA, D.; FOCK, I.; VANIET, S.; CARMEILLE, A.; GOUSSET, C.; SIHACHAKR, D.; LUISETTI, J.; KODJA, H.; BESSE, P. RAPD genetic homogeneity and high levels of bacterial wilt tolerance in *Solanum torvum* Sw. (Solanaceae) accessions from Reunion Island. **Plant Science**, v.166, n. 6, p. 1533-1540, 2004.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. **Food Chemistry**, v. 112, p. 587-594, 2009.

CROCHEMORE, M.L.; MOLINARI, H. B. C, AND VIEIRA L.G.E. Genetic Diversity in Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Evaluated by RAPD Markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.4, p. 521-527, 2003.

CRUZ-CRUZ, C.A.; GONZÁLES-AENAO, M. T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. **Resources**. v. 2. p. 73-95. 2013.

CUERVO, I.M. Evaluación de los contenidos metabólitos en cultivos de células de *Petiveria alliacea* L. (Anamú). 2011. 105f. (Dissertação – Biotecnologia vegetal) Universidad Nacional de Colômbia, Facultad de Ciências, Medellín, Colômbia, 2011. Disponível em: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6039/1/75098061.2011.pdf>

DE LIMA, T.C.; MORATO, G.S.; TAKAHASHI, R.N. Evaluation of antinociceptive effect of *Petiveria alliacea* (Guiné) in animals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p.153-158, 1991.

DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; BEZERRA, R.J.A.C.; BERNARDO-FILHO, M.; CABRAL-NETO, J.B.; LAGE, C.A.S.; LEITÃO, A.C.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A. Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. **Toxicology Letters**, v. 116, p.159-163, 2000.

DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; CALDEIRA-DE ARAUJO, A.; MORAES, M.O. Agarose gel electrophoresis in the classroom. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 4, p. 254-257, 2004.

DE SOUSA, J.R.; DEMUNER, A.J.; PINHEIRO, J.A.; BREITMAIER, E.; CASSELS, B.K. Dibenzyl trisulphide and trans-n-methyl-4-methoxyproline from *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v.29, p. 3653-3655, 1990.

DELLE-MONACHE, F.; MENICHINI, F.; SUAREZ, L.E.C. Substances from *Petiveria alliacea*: II further flavanoides and triterpenes. **Gazzeta Chimica Italiana**, v. 126, p. 275-278, 1996.

DELLE-MONACHE, F.; SUAREZ, L.E.E. 6-c-formil and 6-c-hydroxymethyl flavanones from *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v.31, p. 2481-2482, 1992.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.

DWIVEDI, S.L.; GURTU, S.; CHANDRA, S.; YUEJIN, W.; NIGAM, N. Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm - I: RAPD analysis. **Plant Breeding**, v.120, p.345-349, 2001.

ENGELMAN, F. *In vitro* conservation methods. In: Callows; Ford-Lloyd and Newbury (eds). **Biotechnology Plant Genetic Resources**. IPGRI. p.119-161, 1997.

ENGELMAN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. **Euphytica**, v.57, p.227-243, 1991.

ENGELMAN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cell development Biology – Plant**, v. 47, p.5-16, 2011.

FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 730 p.:il, 2011.

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

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos. **Contribuição da História dos Produtos Naturais**. v 7, p. 1-8, 2006.

FRIEDBERG EC, WALKER GC, SIEDE W, WOOD RD, SCHULTZ RA AND ELLENBERGER T. DNA Repair and Mutagenesis. **American Society for Microbiology Press**. Washington, 2006.

GAGLIARDI, R.F.; HANAI, L.R.; PACHECO, G.; OLIVEIRA, C.A.; CARNEIRO, L.A.; VALLS J.F.M.; MANSUR, E.; VIEIRA, M.L.C. Assessment of genetic stability among *in vitro* plants of *Arachis retusa* Krapov. & W.C.Gregory & Valls using RAPD and AFLP markers for germplasm preservation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p.307-312, 2007.

GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; COCULILO, S.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). **Biodiversity and Conservation**, v. 9, p. 943-951, 2000.

GASPAR, L. Plantas Medicinais. 2009. Pesquisa Escolar Online, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br>>. Acesso em: 25 Março 2016.

GEORGE, E.F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ed. v. 1. p. 1-28, 2008.

GLOBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUEDES, A.P.; CARDOSO, V.N.; DE MATTOS J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; MATOS, V.C.; SILVA, J.C.F.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A. Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 33, p. 915-921, 2006.

GUIMARÃES, A. P. M. **Avaliação da estabilidade genética de berinjela (*Solanum melongena*) obtidas por diferentes mecanismos de regeneração *in vitro***. 2007, 71 f. (Mestrado – Biociência Nucleares). Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro.

HAMEDT, A.L.; ORTIZ, I. C.; HUERTAS, P.A.G.; SAENZ, J.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A.; DE MATTOS, J.CP.; RODRIGUEZ-GASQUEZ, M.A.; CHAVEZ, O.T. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of crude extracts and fractions from *Piper jericense* with trypanocidal action. **Journal Acta Tropica**, p.92-97, 2013.

HAO, Y-J.; LIU, Q-L.; DENG, X.X. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. **Cryobiology**, v.43, p. 46-53, 2001.

HERNÁNDEZ, J. F.; URUEÑA, C. P.; CIFUENTES, M. C.; SANDOVAL, T.A.; POMBO, L.M.; CASTAÑEDA, D.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. A *Petiveria alliacea* standardized fraction induces breast adenocarcinoma cell death by modulating glycolytic metabolism. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 153, p.641-649, 2014.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios de Análise Instrumental. 6ª edição. Porto Alegre. **Book man**. 1056 il. 2009.

HOSSAIN, M.A.; KONISHO, K.; MINAMI, M.; NEMOTO, K. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Euphytica**, v.130, p. 233-239, 2003.

HOU, J.; WU, Y.; SHEN, Y.; MAO, Y.; LIU, W.; ZHAO, W.; MU, Y.; LI, M.; YANG, M.; WU, L. Plant regeneration through somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature zygotic embryos of *Sapium sebiferum* Roxb. **Scientia Horticulturae**. v. 187, p.218-225, 2015.

HOYOS, L.S.; AU, W.W.; HEO, M.Y.; MORRIS, D.L.; LEGATOR, M.S. Evaluation of the genotoxic effects of a folk medicine, *Petiveria alliacea* (anamu). **Mutation Research**, v. 280, p. 29-34, 1992.

HU, J.; GAO, X.; LIU, J.; XIE, C.; LI, J. Plant regeneration from petiole callus of *Amorphophallus albus* and analysis of somaclonal variation of regenerated plants by RAPD and ISSR markers. **Botanical Studies**, v. 49, p. 189-197, 2008.

JAN, S.A.; SHAH, S.H.; ALI, S.; ALI, G.M. THE EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON CALLUS INDUCTION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS OF HYBRID TOMATO. **Pakistan Journal of Botany**. v.47, n° 5, p.1671-1677, 2015.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. Edition, McGraw-Hill Book Company, INC. New York, pp: 523, 1940.

JOSE, S.; THOMAS, T.D. High-frequency callus organogenesis, large-scale cultivation and assessment of clonal fidelity of regenerated plants of *Curcuma caesia* Roxb., an important source of camphor. **Agroforest Systems Journal**. v.89, p.779-788, 2015.

JOYCE, S.M.; CASSELLS A.C. Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 125-137, 2002.

K'OPONDO, F. B. O.; RHEENEN, H. A. AND MUASYA, R. M. Assessment of genetic variation of selected spiderplant (*Cleome gynandra* L.) morphotypes from western Kenya. **African Journal of Biotechnology**. V. 8 (18), p. 4325-4332, 2009.

KAEPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 29, p. 125-130, 1993.

KARP, A.; BRIGHT S.W.J. On the causes and origins of somaclonal variation. In: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Vol 2. Milfin, B.J., ed., Oxford University Press. **Oxford**, p.199-234, 1985.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.V.; AYAD, W.G.; HODGKIN, T. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI *Technical Bulletin n.2 International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italy. 1997.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n.6, p. 778 – 800, 2011.

KUBEC, R.; KIM, S.; MUSAH, R.A. S-Substitued cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea* – Part II. **Phytochemistry**, v. 61, p. 675-680, 2002.

KUBEC, R.; KIM, S.; MUSAH, R.A. The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 37-40. 2003.

KUBEC, R.; MUSAH, R.A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 981–985, 2001.

KUMAR, A.; KAUR, R.; ARORA, S.; Free radical scavenging potencial of some Indian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**. v.4, n. 19, p. 2034-2042, 2010.

KUMAR, M.B.; BARKER, R.E.; REED, B.M. Morphological and molecular analysis of genetic stability in micropropagated *Fragaria X Ananassa* cv. Pocahontas. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v. 35, p. 254-258, 1999.

LAKHANPAUL, S.; VELAYUDHAN K.C.; BHAT, K.V. Analysis of genetic diversity in Indian taro *Colocasia esculenta* (L.) Schott] using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, n.6, p. 603-609, 2003.

LANDEY, R. B.; CENCI, A.; GUYOT, R.; BERTRAND, B.; GEORGET, F.; DECHAMP, E.; HERRERA, J.C.; ARIBI, J.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. Assessment of genetic and epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea Arabica*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 122, p. 517–531, 2015.

LANZA, L.L.B.; SOUZA JUNIOR. C.L.; OTTOBONI, L.M.M.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p. 1023- 1030, 1997.

LARKIN P, J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.

LÉDA, P.H.O. *Pesquisa com Plantas Medicinais no Brasil, uma História Antiga*.02/12/2011.Disponível:<http://tecnologiassociales.blogspot.com/2011/02/pesquisa-com-plantas-medicinais-no.html>>. (Acesso em: 29 Março 2016).

LEE, J.; KIM, H.; KIM, J.; JANG, Y. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6490-6496, 2002.

LEMUS, Z.; GARCÍA, M.E.; BATISTA, A.; DE LA GUARDIA, O.; CASTILLO, A. La tableta de anamú: un medicamento herbario inmunoestimulante. **Medisan**, v. 8, p. 57-64, 2004.

LINACERO, R.; ALVES, E.F.; VÁZQUEZ, A.M. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 100, p. 506–511, 2000.

LUZ, D.A.; PINHEIRO, A. M.; SILVA, M.L.; MONTEIRO, M.C.; PREDIGER, R.D.; MAIA, C. S. F.; FONTES-JUNIOR, E. A. Ethnobotany, phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): A review. **Journal of Ethnopharmacology**. v.185, p.182-201, 2016.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R. A. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 101 – 181, 1994.

MARASCHIM, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biociência**, v. 2, p. 24-28, 1999.

MARTIN, C.; GONZALEZ-BENITO, E.; IRIONDO, J.M.; PÉREZ, C. Somaclonal variation in tissue cultures: implications in plant breeding and genetic conservation. **Agro Food Industry Hi Tech**, v. 12, p. 11-13, 2001.

MELO, J.G.; MARTINS, J.D.G.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasileira**. v. 21, p. 27-36, 2007.

MICHELI, M.R.; BOVA, R.; PASCALE, E.; D'AMBROSIO, E. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Methods in Nucleic Acids Research**. v.22, p. 1921-1922, 1994.

MIGUEL, N.N. **Comparação fitoquímica e genética de plantas de “Guiné” (*Petiveria alliacea* L.) comercializadas no Mercado de Madureira – RJ**. Rio de Janeiro, Universidade Castelo Branco. 53p. 2015.

MIKULA, A., NIEDZIELSKI, M., RYBCZYJFC, J. J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. Cell suspension viability after cryopreservation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 28, p. 315-324, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, acessado:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9e43d0044140f579b5affb9cd167b7c/rdc0026_13_05_2014.pdf?MOD=AJPERES em 29 de abril de 2016.

MOBOT © 2010 Missouri Botanic Garden. Science and Conservation Tropicos®.<Disponível em <http://www.Tropicos.Org>>. Acesso: outubro de 2010.

MUJIB, A.; BANERJEE, S.; GHOSH, P.D. Tissue culture induced variability in some horticultural important ornamentals: chromosomal and molecular basis. A review. **Biotechnology**. v. 12. n° 6. p.213 – 224. 2013.

MUNIROH, A. M. S.; SARIAH A, M.; ZAINAL ABIDIN A. M. A.; LIMA B. N.; PATERSON B. R. R. M. Rapid detection of Ganoderma-infected oil palms by microwave ergosterol extraction with HPLC and TLC. **Journal of Microbiological Methods**. v. 100. p 143 – 147. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised method for rapid growth & bioassays with tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p. 473-479, 1962.

NARANJO, E. J.; BETIN, O.F.; TRUJILLO, A. I. U.; POSADA, R.C.; GARCÉS, L.A. Efecto del genotipo sobre la regeneración *in vitro* de *Stevia rebaudiana* a través de embriogénesis somática. **Acta Biológica Colombiana**. v. 21, n.1, p. 87-98, 2015.

NETO, S.P.S.; ANDRADE, S.R.M. *Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações*. In: Faleiro, F.G; Andrade, S.R.M.; Junior, F. B. R. *Biociência estado da arte e aplicações na agropecuária*. Planatina, DF. **Embrapa Cerrados**, Capítulo 14, p. 411 – 434. 2011

OFFEI, S.K.; ASANTE, I.K AND DANQUAH, E.Y. Genetic structure of seventy cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) accessions in Ghana based on RAPD. **Hereditas**, v. 140 (2), p. 123-128, 2004.

OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO, E.; OKAJIMA, H. Antioxidant activity of the new thiosulfinate derivative, S-benzyl phenylmethanethiosulfinate from *Petiveria alliacea* L. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 1097-1102, 2008.

PACHECO, G.; CARDOSO, S.R.S.; GAGLIARDI, R. F.; CARNEIRO, LEONARDO ALVES ; VALLS, J.F.M. ; FERREIRA, P.C.G. ; CARDOSO, M.A. ; MANSUR, E. . Genetic and epigenetic analyses of *in vitro* -grown plants of *Arachis villosulicarpa* Hoehne (Leguminosae) obtained from seed explants through different regeneration pathways. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 83, p. 737-742, 2008a.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R. F.; CARNEIRO, L.A. ; VALLS, J.F.M. ; MANSUR, E. . Plant regeneration in *Arachis stenosperma* Krapov. & W.C. Gregory from roots and calluses derived from leaves of *in vitro* plants. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 44, p. 14-17, 2008b.

PAN, H.; ZHOU, H.; ZENG, S.; XU, X.; AN, H.; JIANG H. Identification of simultaneous determination of p-FHA and p-FBA, two metabolites of anti-tumor agent-Fluorapacin in rat urine. **Journal of Chromatography**, v. 877, p. 1553-1560. 2009.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In The Role of Biotechnology for the Characterization and Conservation of Crop, Forest, Animal and Fishery. **Genetic Resources in Developing Countries**. p 43–54. 2005.

PARDO, A.; HERNÁNDEZ, A.; MENDEZ, N.; ALVARADO, G. Análises genético, mediante marcadores RAPD, de microbulbos de ajo conservados e irradiados *in vitro*. **Bioagro**, v. 27, n. 3, p. 143 – 150, 2015.

PETTINELLI, J. A. **Conservação *in vitro* de germoplasma de *Petiveria alliacea* L. utilizando cultura de tecidos e criopreservação**. 2013 (Mestrado – Biologia Vegetal) – 57f. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2013.

PIMENTA, M. S. G. **Multiplicação *in vitro* de plantas de "Guiné" oriundas de diferentes populações do Rio de Janeiro**. 2015 (Monografia – Ciências Biológicas). 46 f. Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Faculdade de Formação de Professores 2015.

POOJA, A.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 1821-1829, 2011.

RAMIREZ, E.C. Allinases. **Food Science and Technology**, v. 122, p. 143-150, 2003.

RANI, G.; TALWAR, D.; NAGPAL, A.; VIRK, G.S. Micropropagation of *Coleus blumei* from nodal segments and shoot. **Biologia Plantarum**, v.50, n° 4, p. 496-500, 2006.

REED, B. M.; GUPTA, S.; UCHENDU, E. E. *In vitro* Genebanks for Preserving Tropical Biodiversity. Conservation of Tropical Plant Species pp 77-106 Date: 27 June 2012 **In vitro**. 2013.

REINIGER, I. W.; SILVA, C. R. S.; FELZENSZWALB, I.; DE MATTOS J. C. P.; OLIVEIRA, J. F.; DANTAS, F. J. S.; BEZARRA, R. J. A. C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BERNARDO-FILHO, M. Boldine action against the stannous chloride effect. **Journal Ethnopharmacology** v. 68, p. 345 – 348, 1999.

ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus*. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 293-296, 2003.

ROSNER, H., WILLIAMS, L.A.D., JUNG, A., KRAUS, W. Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 40, p.166-177, 2001.

ROUT, G.R.; DAS, P.; GOEL, S.; RAINA, S.S. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger show in random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.39, p. 23-27, 1998, 2006.

SAKAI, A. & ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. **CryoLetters**. v. 28, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A., KOBAYASHI, S., OIYAMA, I. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAZE, H. Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, p. 527–536, 2008.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. **Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações**. In: CID, L. P. B. Cultura *in vitro* de plantas. Brasília, DF. Embrapa, 2014. Capítulo 7 p. 179 – 236.

SEBASTIANI, M. S.; FICCADENTI, N. *In vitro* plant regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* and genetic stability evaluation using RAPD analysis. **Plant Cell Tiss Organ Culture** v.124, p. 69–79. 2016.

SEMAGM, K.; STEDJE, B., BJORNSTAD, A. Analysis of genetic diversity and structure in Ethiopian populations of *Phytolacca dodecandra* using RAPD. **Hereditas**, v. 135, p. 51-50, 2001.

SHRIFIFAR F, DEHGHN-NUDEH G, MIRTAJALDINI M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. **Food Chemistry**, v.112, p. 885-888. 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFSC, 2007.

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

SOARES, B.O. **Caracterização botânica de plantas de *Petiveria alliacea* L. ocorrentes no Rio de Janeiro e estabelecimento do cultivo *in vitro***. (Monografia – Biologia Vegetal) Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2010.

SOARES, B.O. **Micropropagação e avaliação da potencialidade genotóxica de *Petiveria alliacea* L.** 2011. 92 f. (Mestrado – Biologia Vegetal) Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2011.

SOARES, B.O.; FERNANDES, D. C.; CANTELMO, L.; ROCHA L. P., PETTINELLI, J. A.; CHRISTO A. G.; COELHO, M. G. P.; GAGLIARDI, R. F. Botanical characterization of *Petiveria alliacea* L. from Rio de Janeiro, Brazil: Systematic and functional implications. **Plant Biosystems**, v.147, p. 411-417, 2013.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. Introdução à micropropagação de plantas. Bahia, Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 152 p. 2006.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v.9, p.103-117, 2007.

SOUZA, C.F. **Plantas medicinais utilizadas no município de Paracambi – RJ: uma abordagem didática para o ensino fundamental**. Monografia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2015.

SOUZA-MOREIRA T.M, SALGADO H.R.N., PIETRO R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(3): 435-440, 2010.

STEDJE, B.; BUKENYA-ZIRABA, R. RAPD variation in *Solanum anguivi* Lam. and *S. aethiopicum* L. (*Solanaceae*) in Uganda. **Euphytica**, v.131, p. 293–297. 2003.

SUBRAMANIAN, V.; GURTU, S.; NAGESWARA, R.C.; NIGAM, S.N. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **Genome**, v.43, p.656-660, 2000.

TAGIPUR, E. M.; SEKER, G.; MENDI, Y.Y.; SILVA J.A.T. *Somatic Embryogenesis, Cryopreservation and In vitro. Mutagenesis in Cyclamen*. A. Mujib. p- 155 – 167, 2016.

TAYLOR, L. The healing power of rainforest herbs - A guide to understanding and using herbal medicinals. Garden City Park, NY: **Square One Publishers**, p. 535, 2005.

TRIPATHI, L.; TRIPATHI, J.N. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 2, p. 243-253, 2003.

TYUB, S.; KAMILI, A.N.; BHAT, M.M. *In vitro* propagation of *Althaea rosea* – a valuable medicinal plant of Kashmir Himalaya. **Journal of Nature and Natural sciences**. v. 1, n° 5, p-1-4, 2016.

UDULUTSCH, R.G.; PINHEIRO, M.H.O.; TANNUS, J.L.S.; DIAS, P.; FURLAN, A. Phytolaccaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Melhem TS & Giuliatti AM (Orgs.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo** – v. 5. Ed. Instituto de Botânica / FAPESP, São Paulo, p. 494, 2007.

URUEÑA, C.; CIFUENTES, C.; CASTAÑEDA, D.; ARANGO, A.; KAUR, P.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.8, p.1-17, 2008.

VANISRE, E.M.; LEE, C.Y.; LO, S.F.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H.S. 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.

VARGHESE, R.J.; BAYYAPUREDDY, A.; PUSHPARAJ, S.P.; SEENI, S. A high efficiency *in vitro* regeneration protocol and clonal uniformity analysis in *Hypericum hookerianum* Wight & Arn., a lesser known plant of ethnomedicinal and economic importance. **Brazilian Journal of Botany**. v. 39, n°1, p. 377-386, 2016.

VICENTE, C.; METZ, T.; ALERCIA, A. Descriptors for genetic markers technologies. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome Italy. 2004.

VIEIRA, M.L.C.; FUNGARO, M.H.P.; JUBIER, M.F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.305-310, 1997.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELLEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP - a new technique for DNA-fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407- 4414, 1995.

WEBSTER, S.A., MITCHELL, S.A., GALLIMORE, W.A., WILLIAMS, L.A.D., AHMAD, M.H. Biosynthesis of Dibenzyl Trisulfide (DTS) from somatic embryos and rhizogenousembryogeniccallus derived from Guinea hen weed (*Petiveria alliacea* L.) leaf explants. **In vitro Cellular Developmental Biological Plant**, v. 44, p. 112-118, 2008.

WELSH J and MCCLELLAND M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. 18: 7213-7218.

WILLIAMS, L.A.D.; ROSNER, H.; LEVY, H.G.; BARTON, E.N. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L (Guinea hen weed, anamu). **West Indian Med Journal**, v. 56, p. 17-21, 2007.

WINARTO, B.; RACHMAWATI, F.; PRAMANIK, D.; SILVA, J.A.T. Morphological and cytological diversity of regenerants derived from half-anther cultures of anthurium. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v.105, p. 363–374, 2011.

XIMENES, S.C.C. **Ensaio toxicológico pré-clínicos com extratos bruto seco de folhas de *Petiveria alliacea* Linné**. (Mestrado – Ciências Farmacêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.